UNIWERSYTET GDAŃSKI

IN MARI VIA TUA

CHEMIA UG

Załącznik 2

AUTOREFERAT

Omówienie cyklu publikacji pt.

„Zastosowanie cieczy jonowych oraz nowych metod derywatyzacyjnych i ekstrakcyjnych w analityce wybranych farmaceutyków”

Magda Caban

Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 2018

VISIT…

LANZAROTE

Caliente.COM

1. Imię i nazwisko: Magda Caban

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- **Doktor Nauk Chemicznych**

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, 10.07.2013

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Porównanie oraz opracowanie nowych metod oznaczania wybranych farmaceutyków w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej"

Promotor: prof. dr hab. inż. Marek Kwiatkowski

- Studia podyplomowe „Ocena ryzyka dla nowych substancji chemicznych w kontekście europejskiego systemu REACH" (2010-2011)

- **Magister Ochrony Środowiska**

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Kierunek studiów: Ochrona środowiska, 19.06.2009

Tytuł pracy magisterskiej: „Analiza jakościowa i ilościowa wybranych stymulantów wzrostu w próbkach pochodzenia naturalnego"

Promotor: prof. dr hab. Piotr Stepnowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2018-10-01 Kierownik Pracowni Analityki i Monitoringu Środowiska

2014-04-01 do obecnie - Adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

2012-10-22 do 2014-03-31 - Asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

4. Wskazanie osiągniecia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2006 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. Z 2016 r. poz. 1311.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl publikacji na temat: „**Zastosowanie cieczy jonowych oraz nowych metod derywatyzacyjnych i ekstrakcyjnych w analityce wybranych farmaceutyków**"

B) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

[H1] H. Męczykowska*, P. Stepnowski, **M. Caban**, 2018, Impact of humic acids, temperature and stirring on passive extraction of pharmaceuticals from water by trihexyl(tetradecyl)phosphonium dicyanamide, Microchemical Journal, DOI 10.1016/j.microc.2018.07.023. **IF_{2017} = 2,746**

[H2] K. Kołecka*, M. Gajewska, P. Stepnowski, **M. Caban**, 2018, Spatial distribution of pharmaceuticals in conventional wastewater treatment with Sludge Treatment Reed Beds technology, Science of the Total Environment, 647, 149-157. **IF_{2017} = 4,610**

[H3] M. Caban*, P. Stepnowski, 2018, Silylation of acetaminophen by trifluoroacetamide-based silylation agents, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 154, 433-437. **IF_{2017} = 2,831**

[H4] P. Łukaszewicz, A. Białk-Bielińska, J. Dołżonek*, J. Kumirska, **M. Caban**, P. Stepnowski, 2018, A new approach for the extraction of tetracyclines from soil matrices: application of the microwave-extraction technique, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410, 1697-1707. **IF_{2017} = 3,307**

[H5] F. Silva, **M. Caban**, M. Kholany, P. Stepnowski, J. Coutinho, S. Ventura*, 2018, Recovery of non-steroidal anti-inflammatory drugs from wastes using ionic liquid-based three-phase partitioning systems. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 6, 4574–4585. **IF_{2017} = 6,140**

[H6] H. Męczykowska*, P. Stepnowski, **M. Caban**, 2018, Effect of salinity and pH on the calibration of the extraction of pharmaceuticals from water by PASSIL, Talanta, 179, 271–278.

IF_{2017} = 4,244

[H7] H. Męczykowska, P. Kobylis, P. Stepnowski, **M. Caban***, 2017, Calibration of Passive Samplers for the Monitoring of Pharmaceuticals in Water-Sampling Rate Variation, Critical Review in Analytical Chemistry, 47, 204-222. **IF_{2016} = 2,667**

[H8] M. Caban*, P. Stepnowski, 2017, The antagonistic role of chaotropic hexafluorophosphate anions and imidazolium cations composing ionic liquids applied as phase additives in the separation of tri-cyclic antidepressants, Analytica Chimica Acta, 967, 102–110. **IF_{2016} = 5,123**

[H9] H. Męczykowska*, P. Kobylis, P. Stepnowski, **M. Caban**, 2017, Ionic liquids for the passive sampling of sulfonamides from water – applicability and selectivity study, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409, 3951-3958. **IF_{2016} = 3,431**

[H10] M. Caban*, A. Szaniawska, P. Stepnowski, 2016, Screening of 17α-ethynylestradiol and non-steroidal anti-inflammatory pharmaceuticals accumulation in *Mytilus edulis trossulus* (Gould, 1890) collected from the Gulf of Gdańsk, Oceanological and Hydrobiological Studies, 45, 605–614. **IF_{2016} = 0,519**

[H11] F. Silva, **M. Caban**, P. Stepnowski, J. Coutinho, S. Ventura*, 2016, Recovery of ibuprofen from pharmaceutical wastes using ionic liquids, Green Chemistry, 18, 3749–3757. **IF_{2016} = 8,506**

[H12] M. Caban*, H. Męczykowska, P. Stepnowski, 2016, Application of the PASSIL technique for the passive sampling of exemplary polar contaminants (pharmaceuticals and phenolic derivatives) from water, Talanta, 155, 185–192. **IF_{2016} = 4,162**

[H13] M. Caban*, E. Lis, J. Kumirska, P. Stepnowski, 2015, Determination of pharmaceutical residues in drinking water in Poland using a new SPE-GC-MS(SIM) method based on Speedisk extraction disks and DIMETRIS derivatization, Science of Total Environment, 538, 402-411. **IF_{2015} = 3,976**

[H14] M. Caban, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, J. Maszkowska, M. Wagil, J. Kumirska*, 2015, Comparison of the Usefulness of SPE Cartridges for the Determination of ß-Blockers and ß-Agonists (Basic Drugs) in Environmental Aqueous samples, Journal of Chemistry, ID

195280, 1-9. **IF2015 = 0,622**

[H15] J. Kumirska*, N. Migowska, **M. Caban**, P. Łukaszewicz, P. Stepnowski, 2015, Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and oestrogenic hormones in environmental solid samples, Science of Total Environment, 508, 498-505. **IF_{2015} = 3,976**

[H16] M. Wagil, J. Maszkowska, A. Białk-Bielińska*, **M. Caban**, P. Stepnowski, J. Kumirska, 2015, Determination of metronidazole residues in water, sediment and fish tissue samples, Chemosphere, 119, S28-S34. **IF_{2015} = 3,698**

[H17] **M. Caban**, K. Mioduszewska, P. Łukaszewicz, N. Migowska, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, J. Kumirska*, 2014, A new silylating reagent - dimethyl(3,3,3-trifluoropropyl)silyldiethylamine - for the derivatisation of non-steroidal anti-inflammatory drugs prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis, Journal of Chromatography A, 1346, 107-116. **IF_{2014} = 4,169**

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

- **Wstęp**

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego substancjami leczniczymi zostało po raz pierwszy zidentyfikowane jako istotny problem ekologiczny na początku lat 90-tych. Stało się to głównie za sprawą oznaczenia tych związków na poziomie śladowym w różnych matrycach środowiskowych. Było to możliwe dzięki znaczącemu postępowi w chemii analitycznej w zakresie możliwości korzystania z coraz nowocześniejszych rozwiązań technik łączonych, w szczególności spektrometrii mas i jej sprzęgnięcia z technikami chromatograficznymi. Nie bez znaczenia było także nowe, efektywne podejście do wydzielania i zatężania analitów ze złożonych matryc środowiskowych. Zasadniczym przełomem stało się tu zastosowanie nowych, wydajnych układów (np. ekstrakcja do fazy stałej, mikroekstrakcja) czy wprowadzenia elementów wspomagania procesu ekstrakcyjnego (np. energią mikrofal, strumieniem rozpuszczalnika). Istotny postęp poczyniono także w stosowaniu nowych materiałów jako mediów odbierających; syntetyczne polimery, materiały węglowe i magnetyczne, nanomateriały, ciecze jonowe i wiele innych nowych materiałów coraz częściej

stosowane są w procesach ekstrakcji z próbek wodnych analitów o szerokim zakresie polarności. Nowe rozwiązania są także zgodne z wyzwaniami w zakresie zielonej chemii, szczególnie w kwestii miniaturyzacji i automatyzacji aparatury, skrócenia czasu i kosztu analiz oraz eliminacji lub oszczędności rozpuszczalników bądź ich zastąpienia mniej szkodliwymi odpowiednikami.

Z punktu widzenia analityki chemicznej, oznaczenia farmaceutyków w matrycach środowiskowych wiążą się z wieloma problemami. Po pierwsze są to związki o niezwykle zróżnicowanej budowie chemicznej i wynikających z nich właściwościach fizykochemicznych. Użyta technika musi być na tyle selektywna, aby wyizolować i oznaczyć analitycznie istotną ilość farmaceutyków na raz (często osiągnąć tu należy kompromis na pewnym etapie oznaczania), co wiąże się jednak z równoczesną izolacją dużej liczby interferentów. Jednym z podejść może być tu opracowywanie metod, które selektywnie zawęża się do jednej grupy chemicznie podobnych do siebie farmaceutyków (np. metody wyodrębniania wyłącznie sulfonamidów lub tylko beta-blokerów). Powoduje to jednak konieczność stosowania postępowań wieloetapowych co jest z natury niekorzystne, zarówno z ekonomicznego punktu widzenia, jak i z perspektywy założeń zielonej chemii. Zmienność czasowa i przestrzenna próbek środowiskowych oraz zawartych tam matryc jest też czynnikiem generującym niepewność, gdyż dla każdej próbki tzw. efekt matrycowy może być diametralnie różny (Caban et al., 2012). Efekty te nie są wyłącznie uciążliwe w oznaczeniach środowiskowych, ale w przypadku wszystkich złożonych próbek bogatych w składniki inne niż anality (próbki kliniczne, próbki żywności, itd.). Jest to tym istotniejsze, iż farmaceutyki w środowisku wodnym występują na śladowych poziomach stężeń rzędu co najwyżej ng/l. Stąd na etapie walidacji każdej nowej metody analitycznej elementem niezbędnym jest rzetelne oszacowanie efektu matrycowego.

Współcześnie wykrywanie farmaceutyków w próbkach środowiskowych odbywa się wyłącznie z zastosowaniem spektrometrii mas, która daje niemal niezawodną pewność oznaczenia z bardzo niskimi granicami wykrywalności. Jako sprzęgniętą technikę rozdzielczą najczęściej wykorzystuje się wysokosprawną chromatografię cieczową, rzadziej chromatografię gazową (Joanna Sadkowska et al., 2017). Natomiast istnieje wiele technik ekstrakcyjnych, a wybór zależy od typu próbki, celu analizy i dostępności sprzętu. Najczęściej badane próbki wodne to wody powierzchniowe, gruntowe, morskie lub ściekowe. Wśród próbek stałych jako obiektów badań należy wymienić gleby, osady ze zbiorników wodnych,

osady ściekowe, tkanki roślin i zwierząt oraz odchody zwierzęce. Mając na uwadze, że obecnie w użyciu jest ponad 1200 substancji farmaceutycznych a oznacza się często także metabolity lub produkty rozpadu tych związków, liczba opracowywanych i wdrażanych do praktyki analitycznej metodyk jest olbrzymia. Warto przy tym zaznaczyć, iż oznaczanie leków ma na celu nie tylko dostarczenie danych monitoringowych czy screeningowych w warunkach środowiskowych, ale także jest wykorzystywane w ocenie efektywności nowych sorbentów i technik oczyszczania wód i ścieków, przy prowadzeniu testów toksyczności, ekotoksyczności, bioakumulacji i biodegradacji, w końcu w badaniach rozprzestrzeniania się i przemian abiotycznych w różnych warunkach. Cześć rozwiązań w analizie farmaceutyków w środowisku zaczerpnięta została z wcześniej opracowanych metod oznaczeń klinicznych, kryminalistycznych czy przemysłowych.

Opracowywane nowe metody oznaczeń farmaceutyków w próbkach środowiskowych mają jednak szereg ograniczeń i niedociągnięć technicznych. Istotnym problemem jest wciąż niewielka liczba rozwiązań uniwersalnych, umożlwiających równoczesne wyodrębnianie i jednoczesne oznaczanie skrajnie różnych grup substancji leczniczych. Duże ograniczenie stanowi niemal całkowity brak certyfikowanych materiałów odniesienia, brak technik referencyjnych czy spójnych zaleceń co do walidacji metodyk. Wciąż nie zdefiniowano także listy farmaceutycznych zanieczyszczeń priorytetowych, które należałoby objąć regularnym monitoringiem. Należy jednak spodziewać się, że coraz większa liczba doniesień literaturowych dowodzących negatywnych skutków ekotoksykologicznych substancji leczniczych i ich nieoczekiwanych efektów biologicznych (nefrotoksyczność diklofenaku, akwatoksyczność sulfonamidów i in.) doprowadzi do usankcjonowania obowiązku monitoringowego przynajmniej dla części substancji farmaceutycznych wykrywanych w środowisku.

W przypadku dość nietypowej, niejednorodnej grupy analitów do jakich niewątpliwie należą substancje lecznicze rozumiane jako zanieczyszczenia środowiska, wykorzystanie standardowych, konwencjonalnych narzędzi analitycznych jest zwykle mało efektywne. Dlatego ważne jest poszukiwanie alternatywnych rozwiązań, wykorzystujących całą gamę nowych materiałów czy niestandardowego podejścia do rozdzieleń i oznaczeń końcowych skutkujących uniwersalnymi metodami, które można z powodzeniem zastosować w analityce środowiskowej.

Biorąc powyższe pod uwagę **głównym celem przedstawionego osiągnięcia habilitacyjnego było opracowanie innowacyjnych rozwiązań, umożliwiających oznaczanie szerokiej, niejednorodnej chemicznie grupy farmaceutyków, w szczególności w złożonych próbkach środowiskowych.**

W niniejszym opracowaniu przedstawiono cykl publikacji, obejmujących wyniki badań nad zastosowaniem cieczy jonowych jako alternatywnych matryc odbierających w ekstrakcji laboratoryjnej czy próbnikach pasywnych oraz jako dodatków do chromatograficznych faz ruchomych. Przedstawiono także badania nad alternatywnym procesem derywatyzacji z użyciem oryginalnego odczynnika sililującego umożliwiającym wysoce czułe oznaczenia końcowe farmaceutyków z użyciem techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Cykl prezentuje także szereg zwalidowanych metod wykorzystujących wspomaganą ekstrakcję, które zostały następnie użyte do oznaczeń farmaceutyków w środowisku. Dzięki podjęciu tych badań powstał szereg prac dowodzących obecności tego rodzaju zanieczyszczeń na terenie Polski w wodach głębinowych, rzecznych, jeziornych i morskich, tkankach miękkich ryb i małży a także w glebach i osadach dennych.

- **Opis osiągnięcia naukowego**

Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) lub tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) jest dziś metodą wyboru w oznaczeniach końcowych farmaceutyków w próbkach środowiskowych (Joanna Sadkowska et al., 2017). Mimo szeregu zalet jest to technika, która wciąż ma wiele ograniczeń, zwłaszcza w zakresie znaczących efektów matrycowych, dużej chwiejności i zmienności procesu jonizacji i fragmentacji wraz ze zmiennością fazy ruchomej oraz ograniczonej rozdzielczości kolumn. W badaniach będących podstawą osiągnięcia naukowego postanowiono wykorzystać alternatywną technikę, chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS). Technika ta ma szereg istotnych zalet, wśród których wymienić należy: (i) porównywalnie niższy koszt aparatury i jej utrzymania, (ii) znaczne zmniejszenie ilości rozpuszczalników organicznych z procesie analitycznym, (iii) porównywalnie większa sprawność układu separacyjnego gwarantująca zdecydowanie lepsze wyniki precyzji i odtwarzalności opracowywanych metod, (iv) możliwość korzystania z obszernych bibliotek widm masowych, w końcu (v) obecność zestawów GC-MS w niemal wszystkich laboratoriach służb inspekcji ochrony środowiska (w odróżnieniu od LC-MS) (Caban et al., 2011; J. Sadkowska et al., 2017).

Zastosowanie GC-MS w oznaczeniach substancji farmaceutycznych wiąże się jednak z koniecznością przeprowadzenia derywatyzacji analitów, gdyż zdecydowana większość z nich jest zbyt polarna i termicznie niestabilna, by móc być analizowanymi tą techniką. Derywatyzacja w technice GC polega na przeprowadzeniu reakcji zamiany atomu wodoru w grupach funkcyjnych takich jak grupa aminowa, hydroksylowa czy karboksylowa, na ugrupowanie niepolarne. W tym celu stosuje się zwykle odczynniki sililujące, które mają zdolność podstawienia grupy bazującej na atomie krzemu. Jednym z najpopularniejszych tego typu odczynników jest *N,O*-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid (BSTFA), który spochadnia anality do pochodnych trimetylosililowych (TMS). We wcześniejszych badaniach przedstawiono studium porównawcze derywatyzacji wielu farmaceutyków (Caban et al., 2011; Kumirska et al., 2011). Jak stwierdzono, etap ten jest ważny dla późniejszej analizy jakościowej i ilościowej, stąd należy skupić się nad wyborem jego warunków.

Po uzyskaniu stopnia doktora podjęto badania mające na celu określenie właściwości derywatyzujących BSTFA w stosunku do grup amidowych, które bardzo często są problematyczne w oznaczeniach końcowych w związku z uleganiem tautomeryzacji. W pracy [H3] podjęto badania nad upochadanianiem acetaminofenu (występującego od popularną nazwą paracetamol). Posiada on także grupę hydroksylową, która ulega sililowaniu stosunkowo łatwo, co może prowadzić do wytworzenia dwóch pochodnych, co nie jest korzystne w punktu widzenia analizy ilościowej techniką GC. Co ciekawe, odczynnik BSTFA także posiada grupę acetamidową. Dodatkowym problemem było określenie wbudowania grupy TMS w ulegającą tautomeryzacji grupę w acetaminofenie. Pracę rozpoczęto od sprawdzenia wpływu użytych odczynników i rozpuszczalników. Odczynnik BSTFA jest sprzedawany z 1 % dodatkiem katalizatora TMCS (trimetylochlorosilanu). Oceniono, że sam TMCS nie posiada właściwości derywatyzujących. BSTFA +1 % TMCS w obecności takich rozpuszczalników jak pirydyna, octan etylu skutkował powstaniem dwupodstawionej pochodnej acetaminofenu (Tabela 1, [H3]). Natomiast zastosowanie dodatku acetonu i acetonitrylu skutkuje powstaniem dwóch pochodnych, jedno- i dwupodstawionej grupami TMCS. Miejsce podstawienia grup TMCS oceniono interpretując widma mas uzyskanych pochodnych (Rysunek 1, [H3]). Stwierdzono przy tym typowe dla pochodnych TMS schematy fragmentacji, jak usuwanie grup metylowych i grup TMS (Rysunek 2, [H3]). Występował także rozpad beta pierścienia aromatycznego acetaminofenu. Dzięki porównaniu fragmentacji w pochodnej jedno- i dwupodstawionej stwierdzono, że jest tylko jedna możliwa

struktura pochodnej dwupodstawionej, tj. taka, gdzie grupa TMS podstawia się do tlenu grupy amidowej. Stwierdzono także, wbrew powszechnej opinii, że BSTFA może reagować z wymianą obu posiadanych przez ten związek chemiczny grup TMS, gdyż także w jego strukturze dochodzi do tautomeryzacji. Podsumowane w pracy mechanizmy, etapy spochadniania i odkryte reguły podstawiania stanowią istotny zbiór informacji pomocnych do identyfikacji nieznanych związków chemicznych czy też produktów rozpadu bądź transformacji z zastosowaniem techniki GC-MS.

Kolejne badania skupione były na odczynniku dimetylo(3,3,3-1 trifluoropropylo)sililodietylamina (DIMETRIS), który zsyntezowano pod koniec doktoratu. Jest to odczynnik sililujący o selektywnych właściwościach derywatyzujących, ponieważ jak wykazały wstępne badania na kilku grupach farmaceutyków (Caban et al., 2013b, 2013a), reaguje z grupami hydroksylowymi i karboksylowymi, natomiast nie reaguje z grupami aminowymi.

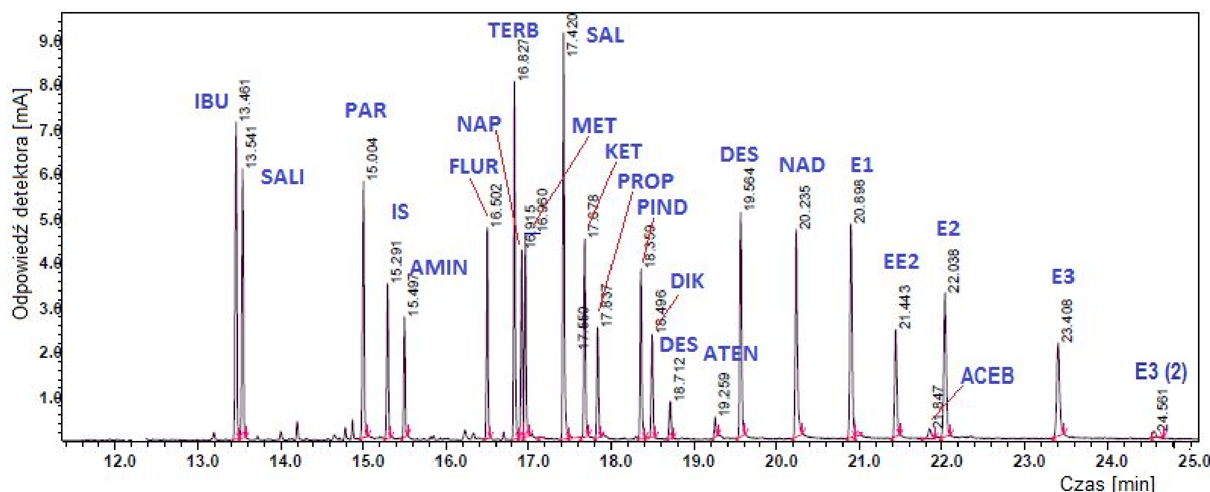
Po uzyskaniu stopnia doktora rozpoczęto badania mające na celu wykorzystanie DIMETRIS do analizy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), których obecność w środowisku wodnym jest wysoce prawdopodobna z uwagi na powszechność ich stosowania jako leków przeciwbólowych dostępnych bez recepty. Badania rozpoczęto od wyboru warunków derywatyzacji wybranych NLPZ (diklofenaku, ibuprofenu, ketoprofen, naproksenu, flurbiprofen), kwasu salicylowego (produkt hydrolizy kwasu acetylosalicylowego) oraz paracetamolu z zastosowaniem DIMETRIS [H17]. Reakcje prowadzono w różnych temperaturach, czasach reakcji i w obecności dodatkowego rozpuszczalnika sprawdzając efektywność derywatyzacji (Tabela 1, [H17]). Podobnie jak we wcześniejszych pracach stwierdzono, że pochodne powstały poprzez przyłączenie grupy dimetylotrifluoropropylosililowej (DMTFPS) do grup hydroksylowych i karboksylowych. Największe współczynniki odpowiedzi uzyskano już w temperaturze 30 °C i w czasie 30 minut, co jest bezkonkurencyjne w stosunku do odczynników dostępnych komercyjnie (Rozdział 3.3, [H17]). Szczegółowa analiza uzyskanych widm mas potwierdziła struktury uzyskanych pochodnych. Na widmach tych obserwowany był sygnał o wartości m/z odpowiadającej jonowi molekularnemu (Rysunek 1, [H17]). Występowała tam też charakterystyczna fragmentacja z odrzucaniem fragmentów o masach 97, 171 i 199, pochodzących od podstawnika DMTFPS. Dzięki temu na widmach mas widoczne było wiele sygnałów o stosunkowo dużych masach, które można było wybrać do analizy w trybie rejestracji wybranych jonów (SIM, ang. *Selected*

Ion Monitoring). Współczynniki odpowiedzi dla pochodnych DMTFPS zostały porównane do pochodnych metylowych i TMS, a więc tych powstałych z popularnie stosowanymi odczynnikami. Dla sześciu z siedmiu analizowanych farmaceutyków najwyższe wartości uzyskano w postaci pochodnych DMTFPS i to niezależnie od zastosowanego stężenia (Rysunek 2, [H17]).

W kolejnym etapie opracowano postępowanie analityczne w celu oznaczeń NLPZ w wodzie powierzchniowej, ściekach surowych i oczyszczonych. Są to matryce niezwykle złożone, stąd podczas opracowywania metody zbadano efekty matrycowe, efektywności ekstrakcji i odzysku całkowitego towarzyszące oznaczaniu wybranych farmaceutyków techniką GC-MS(SIM) z uprzednim etapem ekstrakcji techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. *Solid Phase Extraction*). Wykorzystano w tym celu wcześniej opracowany protokół (Caban et al., 2012). Aby potwierdzić skuteczność DIMETRIS, analogiczne analizy wykonano z zastosowaniem odczynnika BSTFA. Wartości efektywności ekstrakcji i odzysków całkowitych badanych leków były bardzo zbliżone, odpowiednio w zakresach 38-105 % i 48-103 %, bez względu na użyty odczynnik spochadniający. Różnice zaobserwowano jednak w efektach matrycowych, które były znacząco niższe w przypadku zastosowania DIMETRIS (Rys. 3 [H17]). Opracowaną metodę poddano walidacji i zastosowano do oznaczeń mieszaniny NLPZ w próbkach wód morskich oraz ściekach surowych i oczyszczonych. Granice wykrywalności mieściły się w zakresie 4-30 ng/l (Tabela 4, [H17]). Dzięki zastosowaniu opracowanej metody możliwe było oznaczenie farmaceutyków w próbkach wody ściekowej pobranej przed i po oczyszczeniu w Oczyszczalni Wschód w Gdańsku (stężenia w granicach 152-7040 ng/l) oraz w wodzie morskiej w Porcie w Gdyni (<MQL-364 ng/l) i w pobliżu miejscowości Mechelinki (48-616 ng/l), przy czym frekwencja detekcji najwyższa była w ściekach surowych (Tabela 5, [H17]).

Następnie przystąpiono do opracowania metody wieloskładnikowej, łącząc grupy farmaceutyków oznaczane za pomocą odczynnika DIMETRIS. Postanowiono połączyć farmaceutyki z grupy NLPZ, beta-blokerów, beta-agonistów oraz hormonów estrogennych (łącznie 23 anality) [H13]. Opisane wcześniej badania próbek środowiskowych wykonane były stosując na etapie ekstrakcji kolumienki SPE (Oasis HLB®, Waters) z wypełnieniem kopolimerowym polistyrenu, diwinylobenzenu i winylopirolidonu (PS-DVB-VP). Kolumienki te w przypadku próbek wysokoobjętościowych mają ograniczoną pojemność sorpcyjną. W badaniach postanowiono więc wykorzystać dyski do przyspieszonej ekstrakcji (Speedisk®,

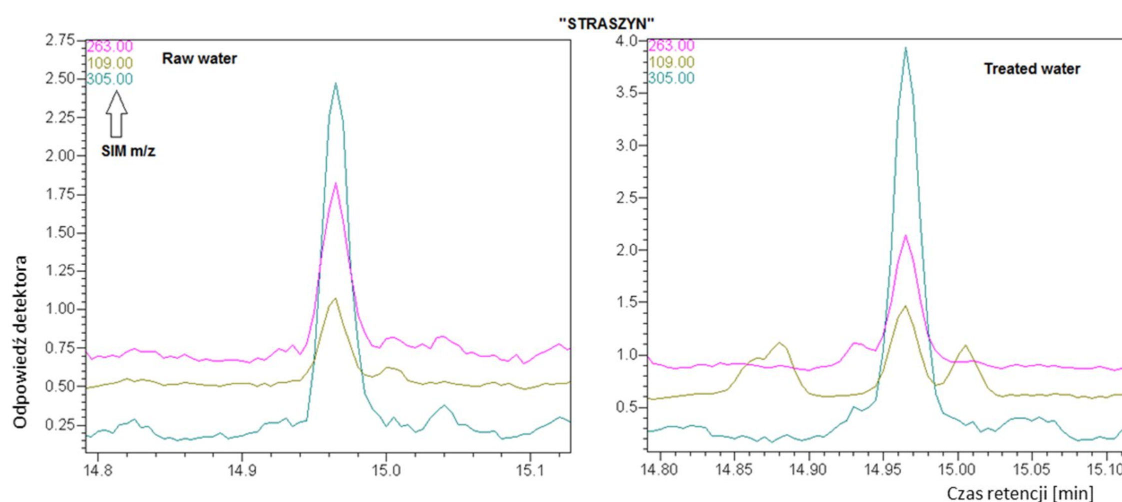
J.T. Baker) z tym samym wypełnieniem, z użyciem których możliwa jest szybka ekstrakcja dużej objętości wody. Dyski te dzięki specyficznej budowie wewnętrznej zapewniają szybszą ekstrakcję bez strat analitów. Również w tym przypadku przeprowadzono walidację i uzyskano zadowalające granice wykrywalności, z zakresie 0,3-4,8 ng/l (Tabela 1, [H13]). Chromatogram gazowy analizy wzorców wchodzących w skład mieszaniny w postaci pochodnych DMTFPS przedstawia **Rysunek 1**.



Rysunek 1. Chromatogram gazowy (GC/MS) analizy 23 farmaceutyków w postaci pochodnych DMTFPS (Rysunek 1, [H13])

Niskie granice wykrywalności pozwoliły na oznaczenia wybranych farmaceutyków w próbkach wody przeznaczonej do picia. Dzięki opracowanej i zwalidowanej procedurze SPE(Speedisk)-GC-MS(SIM) (opisanej w kolejnych paragrafach) możliwe były pionierskie badania obecności farmaceutyków w źródłach wody pitnej w Polsce. Pobrane zostały próbki wody z ujęcia wody powierzchniowej w Straszynie oraz ujęć wody gruntowej „Czarny Dwór" i „Zaspa" w Gdańsku (lokalizacja na Rysunku 2, [H13]). Próbki pobrane były przed i po uzdatnianiu. Pobrano także próbki z rzeki Radunia, dostarczającej wodę do zbiornika w Straszynie. Opróbowanie o charakterze przesiewowym miało miejsce w 2013 roku i obejmowało analizę 17 farmaceutyków. Z czterech analizowanych grup farmaceutyków wykryto jedynie przedstawicieli NPLZ (naproksen, diklofenak, ketoprofen, ibuprofen, Tabela 2, [H13]) w stężeniach <MQL-172,7 ng/l, przy czym największą częstość wykrywania (67 %) stwierdzono dla paracetamolu i naproksenu. Związki z grupy NPLZ oznaczono także w ściekach w Oczyszczalni „Wschód" [H17].

Jak to zaznaczono wcześniej identyfikacji poszczególnych farmaceutyków dokonywano z wykorzystaniem czasów retencji oraz wartości m/z wybranych w trybie rejestracji SIM. Każdy z tych parametrów to tzw. punkt identyfikacyjny, przy czym w większości rutynowych protokołów analitycznych zaleca się stosowanie przynajmniej trzech punktów identyfikacyjnych. W badaniach wykorzystywano jedną wartość m/z do analiz ilościowych i od 2 do 4 wartości jonów referencyjnych potwierdzających identyfikację. Dodatkowo postanowiono także wykorzystać stosunek powierzchni sygnałów wybranych do analiz ilościowych względem sygnałów referencyjnych co dodatkowo miało potwierdzać obecność badanego analitu. Łącznie uzyskiwano więc przynajmniej 6 punktów identyfikacyjnych co zdecydowanie zwiększało rzetelność oznaczeń. Na **Rysunku 2** przedstawiono przykładową identyfikację farmaceutyku z zastosowaniem tej metody.



Rysunek 2. Potwierdzenie detekcji paracetamolu w próbkach wody surowej i oczyszczonej pobranej z ujęcia wody powierzchniowej w Straszynie z wykorzystaniem trybu SIM (ang. *Selected Ion Monitoring*) (Cześć Rysunku 3, [H13])

W kolejnej pracy skupiono się na opracowaniu efektywnych metod opartych o technikę SPE z zachowaniem możliwie wysokich poziomów odzysku analitów oraz osiągnięciem możliwie niskiego efektu matrycowego. Przebadano różne złoża oraz procedury dla leków z grup beta-blokerów i beta-agonistów. Związki te posiadają charakter zasadowy (pKa 8,8-10,7) i w warunkach pH wód naturalnych są obdarzone ładunkiem dodatnim. W ich ekstrakcji używane były dotychczas różnego rodzaju złoża, począwszy od modyfikowanych sorbentów krzemionkowych po syntetyczne kopolimery [Tabela 1, H14]. Szczególnie te ostatnie

umożliwiły ekstrakcję związków polarnych, gdyż ich modyfikacja jest względnie łatwa na etapie syntezy. Obecnie najbardziej popularnym złożem jest układ typu HLB (ang. *Hydrophilic-Lipophilic Balance*), który chemicznie jest kopolimerem polistyrenu, diwinylobenzenu i winylopirolidonu (PS-DVB-VP). Jego zwilżalność jest znacznie lepsza od złóż krzemionkowych, oferuje też szereg oddziaływań polarnych z badanymi związkami. W pracy przebadano możliwość zastosowania ośmiu rodzajów złóż, różniących się polarnością i funkcyjnością (Tabela 3, [H14]). Były to między innymi nieselektywne złoża typu C18 i złoża kationowymienne. Zastosowano dwie procedury ekstrakcyjne, gdyż złoża kationowymienne wymagają stosowania zmian pH używanych roztworów i próbki (Tabela 4, [H14]). Złoże C18-E, mimo swojego znanego, uniwersalnego charakteru nie sprawdziło się do tego typu analitów. Z zastosowaniem złóż kationowymiennych (Strata-X-C i Oasis MCX) odzyski analitów były mniejsze niż z zastosowaniem złóż polimerowych na bazie PS-DVB. Natomiast kolumna Strata Screen C (połączenie złóż PS-DVB oraz złoża kationowymiennego) okazała się skuteczniejsza, gdy zastosowano procedurę typową dla złóż polimerowych. Ostatecznie wybrano kolumnę Strata-X z wypełnieniem PS-DVB-VP, która zapewniła odzyski w granicach 63-113 % dla całej grupy analitów (Tabela 5, [H14]) oraz lepszą powtarzalność odzysku (względny błąd standardowy <12 %, Rysunek 1, [H14]).

Złoże PS-DVB-VP okazało się w kolejnych etapach badań przydatne także dla innych grup farmaceutyków, gdyż oferuje całą gamę potencjalnych oddziaływań fizykochemicznych. Wiąże się to jednak z równoczesną ekstrakcją dużej liczby interferentów, a tym samym możliwością wzmożenia efektów matrycowych. W związku z tym wprowadzony został etap przemywania złoża dwoma rozpuszczalnikami, tj. 5 % wodnym roztworem metanolu, a następnie heksanem. W dalszych etapach badań takie właśnie postępowanie zostało zastosowane do doczyszczania ekstraktów tkanek ryb czy też ekstrakcji próbek ściekowych. Jednym z przykładów bazujących na takim rozwiązaniu była metoda oznaczeń farmaceutyków z grupy NPLZ (ibuprofenu, paracetamolu, flurbiprofen, naproksenu i diklofenaku) łącznie z dwoma metabolitami diklofenaku w próbkach wody ściekowej [H2]. Celem tych badań było określenie dystrybucji czasowej i przestrzennej farmaceutyków w oczyszczalni w Gniewinie. Zastosowana jest tam unikatowa technologia utylizacji osadów ściekowych za pomocą poletek trzcinowych. Zastosowanie kolumienek Strata-X w procesie SPE, derywatyzacji odczynnikiem BSTFA oraz analizy końcowej techniką GC-MS(SIM) dowiodło efektywność powyższego rozwiązania. Stwierdzono, że ibuprofen i naproksen są obecne jedynie w ściekach

oczyszczonych, natomiast diklofenak posiada niewielki potencjał do usuwania w strumieniu ścieków, jednak jest usuwany na złożach trzcinowych zasilanych osadem nadmiernym (Tabela 6, [H2]). Ponadto wykonano oznaczenia podstawowych parametrów jakości ścieków i nie zauważono jednoznacznych korelacji w usuwaniu wybranych farmaceutyków oraz zmniejszaniu się stężeń biogenów (Tabela 7, [H2]).

Kolumny opisane powyżej wykorzystywane są do ekstrakcji próbek wodnych (lub roztworów organicznych ekstraktów) do objętości 500 ml. W przypadku połączenia procedury SPE w analizą GC (z uprzednią derywatyzacją z użyciem 100 µl odczynnika derywatyzującego) uzyskiwane są współczynniki zatężenia rzędu 5000. Dzięki temu możliwe jest oznaczenie farmaceutyków na przykład w próbce wody ściekowej z metodyczną granicą wykrywalności rzędu kilku ng na 1l próbki ([H17]). W przypadku oznaczeń leków w próbkach wody morskiej czy gruntowej należy jednak osiągnąć znacznie wyższy współczynnik zatężenia, ponieważ farmaceutyki występują w tych próbkach na niższych niż w ściekach poziomach stężeń. W związku z tym opracowano procedurę oznaczeń wybranych farmaceutyków w próbkach wody gruntowej i morskiej z zastosowaniem, podobnie jak to miało miejsce w przypadku wód głębinowych, dysków do przyspieszonej ekstrakcji (Speedisk®, J.T. Baker) ze złożem PS-DVB-VP [H13]. W przypadku ekstrakcji 1,5 l próbki, osiągano współczynnik zatężenia rzędu 150 000. Odzysk wynosił 62-90 % dla NLPZ, 62-112 % dla hormonów estrogennych, 63-105 % dla beta-blokerów i beta-agonistów, natomiast metodyczne granice wykrywalności wynosiły od 0,3 do 5,7 ng/l. Należy tu zaznaczyć, że do derywatyzacji wykorzystano DIMETRIS, a oznaczenia końcowe prowadzono techniką GC-MS opisaną powyżej.

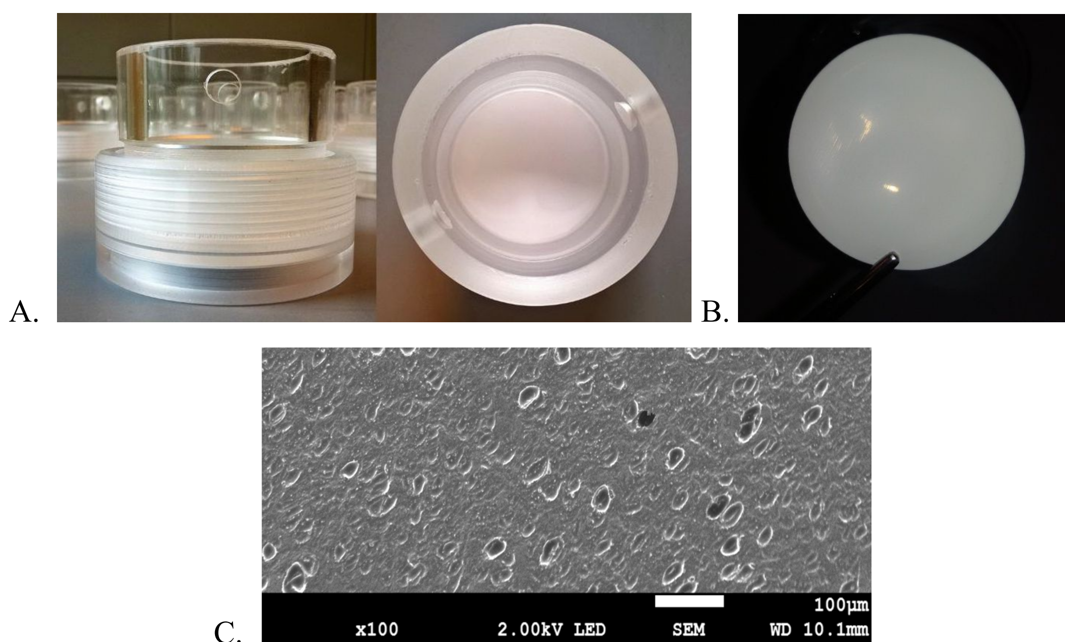
Ekstrakcja do fazy stałej z zastosowaniem kolumn oraz dysków do przyspieszonej ekstrakcji nazwana może być ekstrakcją czynną, gdyż przepływ fazy wodnej przez złoże jest wymuszany. Ekstrakcję taką można jednak wykonać na drodze biernej, tj. wykorzystać zjawisko dyfuzji. Dokonuje się tego używając próbników pasywnych wyposażonych w fazę akceptorową oddzieloną membraną od fazy donorowej, umieszczanych w badanym środowisku na określony czas, w którym analit na drodze dyfuzji przemieszcza się przez pory membrany a następnie jest adsorbowany na fazie. Technika ta posiada szereg zalet. Po pierwsze, wynikiem takiej analizy jest średnie w czasie stężenie analitu, niezależne od chwilowych stężeń obecnych w środowisku, o których informacji dostarcza technika SPE. Po drugie, nie jest konieczne pobieranie próbki wodnej, jej transport do laboratorium i ewentualne przechowywanie, co może

się wiązać ze stratami analitów. Jedną z wad technik pasywnych jest jeszcze ciągle mała wiarygodność wyników, gdyż w trakcie ekspozycji szybkość pobierania analitów może być zaburzona / zwolniona, co szczegółowo opisano w pracy przeglądowej dotyczącej kalibracji próbników ([H7]), czyli wyznaczeniu współczynników pobierania analitów.

Współcześnie, pasywna ekstrakcja farmaceutyków z wody realizowana jest z zastosowaniem dwóch technik – POCIS (ang. *Polar Organic Chemical Integrative Sampler*) oraz Chemcatcher, z zastosowaniem różnych złóż, w tym wcześniej wymienianego PS-DVB-VP [H7]. Z zastosowaniem takich złóż, w laboratorium wykonywana jest re-ekstrakcja analitów. W ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego przeprowadzono nowatorskie badania nad zastosowaniem ciekłych faz akceptorowych, wykorzystując z tym celu wybrane ciecze jonowe. Zastosowanie tych związków w chemii analitycznej ma miejsce od kilku lat ze względu na ich unikatowe właściwości w zakresie rozpuszczalności niezależnej od polarności, trwałości termicznej i chemicznej oraz możliwości projektowania selektywności poprzez zmianę kationu lub anionu. Założono, że przy jednoczesnej nierozpuszczalności w wodzie części cieczy jonowych możliwe będzie zachowanie ich wystarczającej polarności, aby móc ekstrahować polarne anality z grupy farmaceutyków. W ramach grantu Sonata pt. „PASSIL - innowacyjna technika dozymetrii pasywnej wykorzystująca ciecze jonowe" przeprowadzono szereg badań podstawowych w celu oceny możliwości zastosowań cieczy jonowych w pasywnej ekstrakcji farmaceutyków z wody. Oryginalny akronim PASSIL został utworzony na bazie angielskiej nazwy *PASsive Sampling with Ionic Liquids*.

W badaniach wstępnych stanowiących przesłankę stosowania cieczy jonowych jako ciekłych faz akceptorowych, analitami były wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) (Maszkowska et al., 2015) [U12]. Otrzymane efektywności ekstrakcji oraz współczynniki podziału woda-ciecz jonowa potwierdziły użyteczność hydrofobowych cieczy jonowych w ekstrakcji pasywnej WWA z wody. Do badań w ramach osiągnięcia habilitacyjnego wytypowano natomiast anality z grup sulfonamidów, beta-blokerów, NLPZ, hormonów estrogennych a także paracetamol, karbamazepinę i kofeinę.

Badania początkowe obejmowały wybór cieczy jonowej oraz membran stanowiących ich nośniki. We własnym zakresie zaprojektowano i wykonano prototyp próbnika, składający się z dwóch skręcanych obręczy z tworzywa syntetycznego (bez właściwości sorpcyjnych w stosunku do badanych farmaceutyków) oraz membran stanowiących nośnik cieczy jonowych (**Rysunek 3**).



Rysunek 3. Próbnik PASSIL: A. zdjęcie z boku i z góry, B. Membrana PES impregnowana cieczą jonową (dicyjanamidem triheksatetradecylofosfoniowym), C. Obraz SEM membrany impregnowanej cieczą

W ramach badań przetestowano różne ciecze jonowe oparte o kationy alkiloimidazoliowe, alkilopirydyniowe, alkilomorfoliniowe oraz alkilofosfoniowe z różnego rodzaju anionami ([H1, H6, H9, H12]), ostatecznie stwierdzając, że najbardziej stabilne i efektywne w próbnikach były ciecze jonowe o kationie fosfoniowym (przykładowe wyniki odzysków – Rysunek 3, H9). Przetestowano także trzy rodzaje membran, tj. membrany nylonowe, teflonowe i polieterosulfonowe (PES). Po wykonaniu badań techniką SEM (skaningowym mikroskopem elektronowym), stwierdzono, że najlepsze pokrycie membran cieczami fosfoniowymi występuje w przypadku zastosowania membran PES [Rysunek 5, H9]. Są to te same membrany, które stosuje się także w innych technikach pasywnych ([H5]).

Badania przeprowadzano w dwóch układach, semi-statycznym i przepływowym. Pierwszy służył przede wszystkim do oceny mechanizmu ekstrakcji i badania wpływu warunków na efektywność ekstrakcji analitów. W układzie takim pojedynczy próbnik umieszczany był w zlewce, w której znajdowało się 100 ml fazy donorowej (roztworu analitów), a zlewkę umieszczano na mieszadle magnetycznym (przetestowano też układ bez mieszania) w termostacie w temperaturze 20 ºC. Dzięki pobieraniu próbek fazy donorowej oceniano ubytek analitów w czasie (kinetykę) oraz wyznaczano współczynniki pobierania analitów (Równanie 3, [H12]). W układzie przepływowym odbywała się właściwa kalibracja próbników. Wykonano także badania potwierdzające stabilność analitów w warunkach długiej

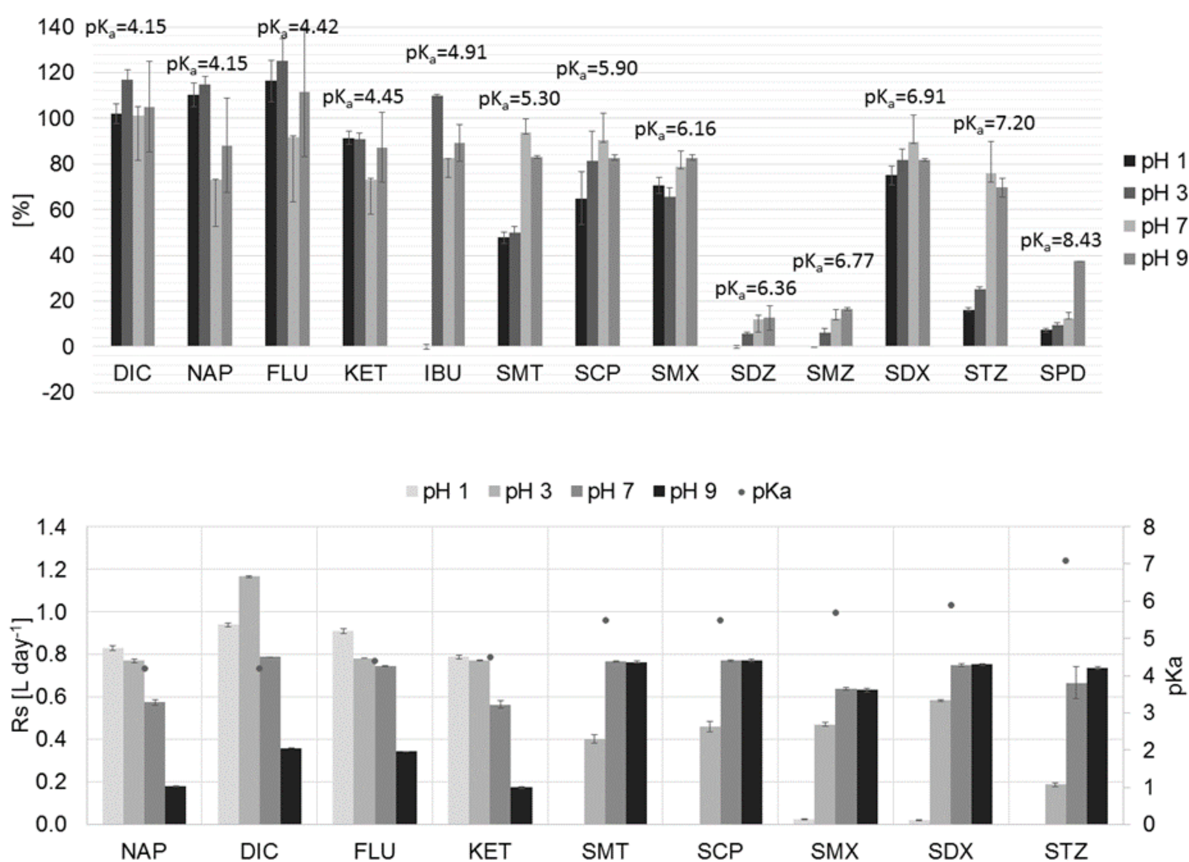
ekspozycji eksperymentów oraz różnych pH, zasoleniu i temperaturze. Stwierdzono także zaniedbywalną sorpcję farmaceutyków na materiale próbnika. Każdorazowo badano także zmiany pH i przewodnictwa roztworów w trakcie długoterminowych eksperymentów.

Ciecze jonowe zbudowane z kationów fosfoniowych, w szczególności dicyjanamid triheksatetradecylofosfoniowy ([P666-14][$N(CN)_2$]) wykazały wysoką selektywność ekstrakcji. Jak pokazują wyniki uzyskane w publikacjach [H1], [H6] i [H12], związki, które nie posiadały ładunku lub były naładowane ujemnie były ekstrahowane z wydajnością znacznie większą niż związki obdarzone ładunkiem dodatnim. Farmaceutyki z grupy beta-blokerów nie ulegały ekstrakcji w ogóle, natomiast karbamazepina ekstrahowana była z wydajnością ok. 20 % (Tabela 2, [H12]). Zbadanie szeregu związków z grupy sulfonamidów pozwoliło stwierdzić, że także dla tej grupy analitów istnieją znaczące różnice w efektywności ekstrakcji, w zakresie od 15 do 105 % (Rysunek 7, [H9]). Tłumaczy to różny stopień zjonizowania tych analitów, zależny od wartości stałych dysocjacji kwasowych (Tabela 1, [H9]). Natomiast wyniki te nie pokryły się z eksperymentalnie wyznaczonymi wartościami stałych podziału ciecz jonowa – woda w warunkach pH eksperymentu (Tabela 1, [H9]). Z kolei ekstrakcja farmaceutyków z grupy NLPZ (diklofenak, naproksen, flurbiprofen, ketoprofen, ibuprofen) i 17α-etynyloestradiolu zachodziła z efektywnością powyżej 80 % (Tabela 2, [H12] oraz Rysunek 1, [H6]). Przyczyny zaobserwowanej selektywności fosfoniowych cieczy jonowych nie da się łatwo wyjaśnić biorąc pod uwagę ich właściwości, ale zapewne ważny jest tu czynnik strukturalny, gdyż ciecze te mają sterycznie rozbudowany kation i relatywnie mały anion. Co ciekawe, trzy inne przebadane ciecze jonowe o kationie triheksatetradecylofosfoniowym, ale różnych anionach, wykazały się podobną stabilnością w próbniku (Rysunek 3, [H9]) i właściwościami ekstrakcyjnymi w stosunku do badanych farmaceutyków. Można więc wnioskować, że to kation jest odpowiedzialny za selektywność. Jego długie łańcuchy alkilowe stanowią fazę rozpuszczającą, w której obecny jest jednak ładunek dodatni działający odpychająco na anality o charakterze kationowym.

Przebadano także efektywność ekstrakcji leków z grupy sulfonamidów z zastosowaniem cieczy jonowej [P666-14][$N(CN)_2$] ze ścieków oczyszczonych (stężenie analitów 2 μg/l) i wód rzecznych (0,002 μg/l) w porównaniu do wody dejonizowanej. Stwierdzono, że dla trzech sulfonamidów (STZ, SMT, SDX) efektywność ekstrakcji nie zmienia się w zależności od matrycy (Rysunek 9, [H9]), dla SCP i SMX widoczny jest znaczny spadek (do 70 %) w matrycach środowiskowych, natomiast SDZ, SPD i SMZ, dla

których w wodzie dejonizowanej maksymalna efektywność ekstrakcji wynosiła 17 %, efektywność ekstrakcji była niemal zerowa. Ekstrakcję mieszaniny analitów wykonano także z użyciem wody morskiej pobranej z Zatoki Gdańskiej ([H6], [H12]). Spadki efektywności ekstrakcji były rzędu kilkunastu procent, za wyjątkiem jednego z sulfonamidów SMX (z 95 % w wodzie dejonizowanej do 28 % w wodzie o zasoleniu 7 PSU) (Tabela S6, materiały dodatkowe do [H12]) oraz diklofenaku (adekwatnie z 90 % do 20 %). W każdym z tych przypadków spadek efektywności ekstrakcji tłumaczyć można trzema czynnikami – innym pH, zasoleniem i zawartością materii organicznej próbek środowiskowych w stosunku do fazy donorowej opartej na wodzie dejonizowanej. Efektywność ekstrakcji w technikach pasywnych nie jest jednak jedynym wyznacznikiem użyteczności metody, pomaga natomiast określić same mechanizmy procesu. Drugim z parametrów, kluczowym dla tej techniki jest współczynnik pobierania. Parametr ten jest wykorzystywany do obliczeń średnich w czasie stężeń analitów (TWAC, ang. *Time Weighed Average Concentration*). Czas jaki podstawia się do wzoru na obliczenie współczynnika Rs (ang. *sampling rate*) zależą od przebiegu kinetyki (przykłady na Rysunku 2, [H12]) i wyznacza się każdorazowo przy eksperymentach semi-statycznych. Porównanie współczynników Rs z efektywnością ekstrakcji (EE) najlepiej obrazują wykresy na **Rysunku 4** (Rysunek 1 i Rysunek 2, [H6]).

W przypadku ekstrakcji leków z grupy NLPZ (DIK, NAP, FLU, KET, IBU) pH fazy donorowej w zakresie 1-9 miało niewielki wpływ na wartości EE. Wartość pH miała jednak wpływ na wielkość parametru Rs tych związków, a więc szybkość ich pobierania - kinetykę procesu (część dolna **Rysunku 4**). Podobne wyniki zaobserwowano dla sulfonamidów, jednak w ich przypadku pH wpływało na wartość EE, co tłumaczyć należy zmianami jonizacji tych analitów i wspomnianą selektywnością fosfoniowych cieczy jonowych. Porównanie wartości Rs i EE dla farmaceutyków z grup NLPZ i sulfonamidów wraz ze zmianą zasolenia fazy donorowej zaprezentowane jest w publikacji [H6]. Wzrost zasolenia w zakresie 0-35 PSU powodował spadki efektywności ekstrakcji farmaceutyków (za wyjątkiem diklofenaku i dwóch sulfonamidów, Rysunek 3, [H6]) oraz zmniejszenie wartości współczynników pobierania (Rysunek 4, [H6]).



Rysunek 4. Porównanie współczynników EE (górna część) i Rs (dolna część) wybranych farmaceutyków analizowanych techniką PASSIL wraz z ich zmianą zależną od pH fazy donorowej [H6]

Kolejnymi testowanymi parametrami była szybkość mieszania, temperatura i obecność rozpuszczonej materii organicznej w wodzie. Wpływ tych parametrów na kalibrację próbników POCIS został omówiony w [H1]. W przypadku techniki PASSIL dowiedziono, iż temperatura nie wpływa znacząco zarówno na wartości efektywności ekstrakcji oraz współczynników Rs (Tabela 1, [H1]). Wpływ materii organicznej (reprezentowanej tutaj przez rozpuszczalne w wodzie kwasy humusowe) także nie był znaczący. Jednak różnice w wartościach EE obserwowano w przypadku NLPZ, które charakteryzują się wysoką hydrofobowością. W przypadku NAP, FLU i IBU obserwowano spadek wartości EE wraz ze wzrostem w stężeniach HA. Z drugiej strony, nie zaobserwowano zmian w wartościach współczynnika Rs (Tabela 1, [H1]). Największy wpływ, zarówno na wartości EE, jak i Rs, miała natomiast szybkość mieszania fazy donorowej. W tym przypadku dla niemal wszystkich z oznaczanych farmaceutyków z grup sulfonamidów i NLPZ zaobserwowano wzrost wartości Rs ze zwiększaniem szybkości mieszania za pomocą mieszadeł magnetycznych (około dwu

lub trzykrotnie ze zwiększeniem obrotów ze 100 na 1000 RPM) (Tabela 1, [H1]). Jest to zjawisko wspólne dla procesów membranowych.

Istotny wpływ zarówno zasolenia, jak i pH roztworu pozornie może stanowić praktyczną przeszkodę stosowania tej techniki. Rozwiązaniem może być tu jednak przeprowadzanie kalibracji próbników PASSIL w warunkach zasolenia i pH podobnych do tych panujących w badanym środowisku. Wpływ powyższych parametrów fazy wodnej na efektywność technik pasywnych przy oznaczeniach farmaceutyków stwierdzony był także dla technik POCIS i Chemcatcher ([H7]). Natomiast niewątpliwym ograniczeniem jest rodzaj analitu w związku z selektywnością omówioną powyżej. Z drugiej strony ta domena może być traktowana jako zaleta ze względu na faworyzowanie analitów obojętnych i obdarzonych ładunkiem ujemnym, czy też niepełną ekstrakcję części składników matryc.

W badaniach przedstawionych w niniejszym osiągnięciu naukowym opracowywano także metody oznaczania wybranych farmaceutyków w stałych próbkach środowiskowych. Ostatecznie powstały 4 metody przedstawione w **Tabeli 1**.

Zaprezentowane metody zostały opracowane w celu oceny obecności farmaceutyków w różnych komponentach środowiska na terenie Polski. Wszystkie metody są wieloetapowe i wykorzystują proste (SLE) lub zaawansowane techniki ekstrakcji rozpuszczalnikowej (MAE, ASE) oraz SPE do doczyszczania uzyskanych ekstraktów. Oznaczenia końcowe wykonywano zarówno techniką GC-MS(SIM), jak i LC-MS/MS(MRM), w zależności od analizowanej grupy leków. Metodyczne granice wykrywalności mieszczą się w zakresie od 0,3 do 31 ng/g mokrej masy.

Metoda III polega na prostej ekstrakcji w układzie ciało stałe-ciecz (SLE) i doczyszczaniu SPE w celu oznaczenia metronidazolu (leku przeciwpasożytniczego) w tkance ryb z hodowli, osadach rzecznych w pobliżu tych hodowli oraz wody z rzeki zasilającej akwakulturę. W tym przypadku ekstrakcja SLE poległa na wytrząsaniu próbki z rozpuszczalnikiem lub ich mieszaniną (testowane parametry w Tabeli 2, [H16]). Dla każdej z matryc ostateczne najefektywniejsze warunki były inne, a walidacja obejmowała także ocenę efektów matrycowych. Uzyskano odzyski w zakresie 89-97 % i efekty matrycowe w zakresie -23-13 % (Tabela 3, [H16]). Dzięki zastosowaniu tej metody możliwa była ocena stopnia zanieczyszczenia środowiska w pobliżu hodowli ryb. Metronidazol wykryty został na poziomie

12,0 ng/g w osadzie rzecznym oraz w stężeniu 1,5 ng/g w próbce ryby z gatunku pstrąg tęczowy.

Tabela 1. Metody oznaczeń wybranych farmaceutyków w próbkach gleby, osadów i organizmów żywych opracowane w ramach osiągnięcia habilitacyjnego

Nr	Technika analityczna	Opis	Rodzaj matrycy	Grupa leków	Anality	Granice detekcji
I [H15]	MAE-SPE-GC-MS(SIM)	Ekstrakcja rozpuszczalnikowa ciało stałe-ciecz wspomagana mikrofalami z doczyszczaniem techniką SPE chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas	Gleby, osady z oczyszczalni ścieków, osady jeziorne	NLPZ, paracetamol, hormony estrogenne	Kwas acetylosalicylowy, Ibuprofen, paracetamol, flurbiprofen, naproksen, diflunisal, ketoprofen, diklofenak, dietylstilbestrol, estron, 17 β-estradiol (E2), 17 α-etynyloestradiol (EE2), estriol (E3)	0,3–5,7 ng/g,
II [H4]	MAE-SPE-LC-MS/MS(MRM)	Ekstrakcja rozpuszczalnikowa ciało stałe-ciecz wspomagana mikrofalami z doczyszczaniem techniką SPE chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas	Gleby	Antybiotyki - Tetracykliny	Oksytetracyklina, tetracyklina, chlorotetracyklina	1,7-2,5 μg/kg
III [H16]	SLE-SPE-LC-MS/MS(MRM)	Ekstrakcja rozpuszczalnikowa ciało stałe-ciecz z doczyszczaniem techniką SPE, chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas	Osady, tkanki ryb	Przeciwpasożytnicze	Metronidazol	0,3-0,4 ng/g
IV [H10]	ASE-SPE-GC-MS(SIM)	Przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikowa z doczyszczaniem techniką SPE, chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas	Tkanki małży	NLPZ, paracetamol, hormony estrogenne	Ibuprofen, paracetamol, flurbiprofen, naproksen, diflunisal, ketoprofen, diklofenak, 17 α-etynyloestradiol (EE2)	3 - 31 ng/g

MAE – ekstrakcja wspomagana energią mikrofalową (ang. *Microwave Assisted Extraction*); SLE – ekstrakcja ciało-stałej ciecz (ang. *Solid-Liquid Extraction*); ASE – ekstrakcja w przyspieszonym strumieniu rozpuszczalnika (ang. *Accelerated Solvent Extraction*); MRM – tryb monitorowania wielu reakcji fragmentacji (ang. *Multiple Reaction Monitoring*); SIM - tryb rejestracji wybranych jonów (ang. *Selected Ion Monitoring*).

Z kolei metodę IV wykorzystano do oznaczeń farmaceutyków w tkankach omułków (*Mytilus edulis trossulus*), dziko żyjących małży bałtyckich pobranych z Zatoki Puckiej [H10]. Organizmy te zostały wytypowane ze względu na charakter wskaźnikowy obecności zanieczyszczeń antropogenicznych; są filtratorami narażonymi na kontakt z większością zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych. Miękkie tkanki małży zostały zliofilizowane a następnie poddane ekstrakcji techniką przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej ASE. Polega ona na ekstrakcji w warunkach podwyższonego ciśnienia i temperatury w specjalnych metalowych kuwetach. Dzięki temu ekstrakcja ze zhomogenizowanego materiału jest szybka, bez termicznego rozkładu analitów i z wykorzystaniem małych objętości rozpuszczalnika. W tym przypadku była to mieszanina wody i metanolu w stosunku objętościowym 1:1. Zastosowano także doczyszczanie techniką SPE z wykorzystaniem kolumn Strata-X. Równolegle z oznaczaniem farmaceutyków z grup NLPZ i 17α-etynyloestradiolu w próbkach małży, te same farmaceutyki oznaczano w wodzie pobranej z miejsca bytowania organizmów. Wodę morską ekstrahowano z wykorzystaniem dysków do przyspieszonej ekstrakcji według metody opisanej w [H13]. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że takie leki jak paracetamol, flurbiprofen i 17α-etynyloestradiol obecnie są w tkankach miękkich małży w stężeniach od 10,5 do 40,4 ng/g mokrej masy, przy czym dwa pierwsze anality posiadają potencjał bioakumulacyjny (Tabela 3, [H10]).

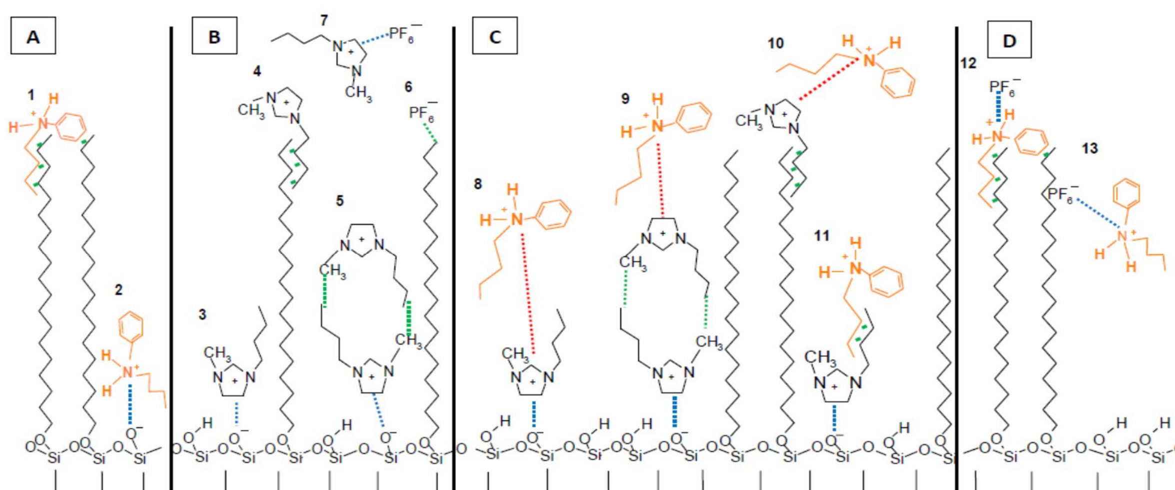
Metody I i II bazują na wykorzystaniu ekstrakcji wspomaganej mikrofalami (MAE). Technika ta wykorzystuje promieniowanie mikrofalowe i zjawisko kawitacji do izolacji związków chemicznych ze stałych próbek, a ekstrakcję wykonuje się w specjalnych teflonowych tubach. Metoda I (MAE-SPE-GC-MS(SIM), [H15]) została opracowana tak, aby posłużyła pierwszym w Polsce oznaczeniom pozostałości leków (siedmiu reprezentantów NLPZ i pięć hormonów estrogennych) w próbkach gleb, osadów z oczyszczalni ścieków i osadów ze zbiornika z hodowlą ryb. Optymalizacja metody polegała na doborze najlepszego układu ekstrakcyjnego oraz sposobu doczyszczania ekstraktu. Ostatecznie odzyski leków mieściły się w zakresie 39-108 % (Tabela 3, [H15]), natomiast metodyczne granice oznaczalności pomiędzy 0,3 a 5,7 ng/g (Tabela 4, [H15]). Stosując zwalidowaną metodę oznaczono szereg analitów w różnego rodzaju próbkach, przy czym najwyższe stężenia oznaczono w osadach z oczyszczalni „Gdańsk-Wschód" (przykładowo ibuprofen 96 ng/g, diklofenak 20 ng/g, Tabela 5, [H15]). Oznaczone stężenia nie były większe od tych obserwowanych w innych częściach świata.

Metoda II MAE-SPE-LC-MS/MS(MRM) posłużyć miała ocenie stopnia skażenia gleb w Polsce tetracyklinami, czyli antybiotykami stosowanymi między innymi w przeszłości jako antybiotykowe stymulatory wzrostu. Do gleb dostarczane są one z osadami ściekowymi i z odchodami zwierząt [H4]. W związku z brakiem podobnych metod oraz informacji na temat niestabilności temperaturowej tetracyklin, przeprowadzono szczegółowy wybór warunków ekstrakcji (Rysunek 1, [H4]). Przetestowano wpływ takich parametrów jak rodzaj mieszaniny ekstrahującej, temperatura ekstrakcji (przy stałej mocy mikrofal 400 W), jej czas i liczbę cykli. Ostatecznie, czynnikiem ekstrahującym była mieszanina acetonitrylu, buforu McIlvaina i 0,1 M EDTA w stosunku objętościowym 2:1:1, temperatura 60 ºC oraz dwa cykle 10-cio minutowe. Odzysk całkowity oksytetracykliny, tetracykliny i chlorotetracykliny wynosił odpowiednio >63 %, >52 % oraz >51 %, niezależnie od stężenia (Tabela 3, [H4]). Walidacja metody z zastosowaniem dwóch gleb różniących się składem wykazała metodyczne granice wykrywalności tetracyklin w zakresie 1,7-2,5 ng/g. Z tak opracowaną metodą przystąpiono do badań próbek środowiskowych pobranych w różnych częściach Polski północnej. Obecność dwóch z trzech badanych tetracyklin stwierdzono w dwóch próbkach gleb w stężeniach kilkunastu ng/g (Tabela 4, [H4]). Obliczone współczynniki ryzyka potwierdziły, że w takich stężeniach wykryte antybiotyki nie stanowią istotnego zagrożenia dla środowiska, jednak sama ich obecność nie powinna być ignorowana.

Kolejnym kierunkiem badań w ramach przedstawionego osiągnięcia było sprawdzenie użyteczności cieczy jonowych stosowanych jako dodatki do faz ruchomych w wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz. Dotychczasowym uzasadnieniem ich stosowania jest możliwość dezaktywacji wolnych silanoli obecnych na krzemionkowych fazach modyfikowanych przez kation cieczy jonowej (np. alkiloimidazoliowy), a tym samym zabezpieczenie analitów o charakterze zasadowym przed niepożądanymi oddziaływaniami z tymi ugrupowaniami, skutkującymi „ogonowaniem" sygnałów chromatograficznych. Zjawisko to było to już szeroko omawiane w literaturze (Fernández-Navarro et al., 2011; Kaliszan et al., 2004), jednak do tej pory nie opisano jednolitego mechanizmu tego procesu.

Do badań wytypowano cztery zasadowe farmaceutyki z grupy trójcyklicznych antydepresantów (doksepinę (DOX), dezypraminę (DES), imipraminę (IMI) i klomipramina (CLO)) oraz jeden związek o charakterze kwasowym (4-dimetyloaminoantypirynę (DMAA)) (Tabela 1, [H8]). Przetestowano szereg składów faz ruchomych (Tabela 2, [H8]), w tym zawierające proste bufory amonowe, trietyloaminę (popularny czynnik

silanolosupresujący), sole używane jako czynniki jonowo-asocjujące (heksafluorofosforan potasu) oraz pięć rodzajów cieczy jonowych opartych o kationy alkiloimidazoliowe i aniony heksafluorofosforanowe lub chlorkowe. Na **Rysunku 5** przedstawiono schematycznie najważniejsze oddziaływania molekularne, które mogą wystąpić podczas obecności przykładowej cieczy jonowej ([Bmim][PF_6]) w układzie rozdzielającym analit zasadowy.



Rysunek 5. Oddziaływania zachodzące pomiędzy (A) zasadowym analitem a fazą stacjonarną, (B) cieczą jonową a fazą stacjonarną, (C) zasadowym analitem a kationem cieczy jonowej, (D) zasadowym analitem a anionem cieczy jonowej

Zaproponowano obecność 13 rodzajów dominujących oddziaływań, które mogą wystąpić, gdy pH fazy przekraczać będzie stałą dysocjacji wolnych silanoli, jednocześnie będąc poniżej wartości pKa zasadowych analitów. Schemat ten dodatkowo komplikuje fakt obecności anionu heksafluorofosforanowego, który z racji charakteru chaotropowego bierze także czynny udział w retencji kationów. W badaniach przy różnych składach faz wyznaczano takie parametry jak czas retencji (t_R), liczba półek teoretycznych (N) oraz współczynnik symetryczności sygnałów chromatograficznych (Tf, ang. *Tailing factor*, którego dozwolone wartości mieszczą się pomiędzy 0,8-1,2). Obecność kationu imidazoliowego zmniejszała czasy retencji analitów oraz poprawiała w małym stopniu współczynnik symetrii (Rysunek 4, [H8]). Występowało jednak poszerzenie szerokości sygnałów chromatograficznych, a co za tym idzie zmniejszenie liczby półek teoretycznych i sprawności całego układu. Stwierdzono, że efekt obecności chaotropowego anionu heksafluorofosforanowego w stosunku do anionu chlorkowego (o charakterze kosmotropowym) znacząco wpływa na czasy retencji czy symetrię sygnałów. Aby zweryfikować rodzaj oddziaływań analitów z fazą stacjonarną w obecności

cieczy jonowej w fazie ruchomej, przeprowadzono także eksperymenty przebiciowe. Wykonuje się je utrzymując stałą ilość dodatku przy wzrastającej ilości dozowanego analitu. Jako dodatki wykorzystano octan amonu, trietyloaminę i chlorek butylometyloimidazoliowy ([Bmim][Cl]), natomiast analitem była klomipramina w ilości od 0,0001 do 10 nM. Zastosowanie cieczy jonowej spowodowało zwiększenie pojemność kolumny, gdyż niezależnie od stężenia analitu symetria sygnału była zachowana (Rysunek 5, [H8]). W przypadku zastosowania octanu amonu, przebicie i ogonowanie zostało stwierdzone już przy 0,1 nM klomipraminy. Natomiast w przypadku zastosowania trietyloaminy, przebicie kolumny i przodowanie sygnału wystąpiło przy ilości klomipraminy od 1 nM. Zastosowanie cieczy jonowej jako dodatku zmniejszyło natomiast znacznie liczbę półek teoretycznych przez wcześniej wspomniane poszerzenie sygnału. W wyniku przeprowadzonych badań w publikacji [H8] podjęto próbę kompleksowego wyjaśnienia złożoności oddziaływań w tak zmodyfikowanych układach rozdzielających. Kation alkiloimidazolilowy nie tylko oddziałuje elektrostatycznie z wolnymi silanolami blokując do nich dostęp, ale także, a może przede wszystkim, wchodzi w dyspersyjną interakcję z łańcuchami alkilowymi fazy (oddziaływanie 4 na **Rysunku 5**) wzbogacając ją o potencjał anionowymienny. Odpychające oddziaływanie kationów (nr 8, 9 i 10 na **Rysunku 5**) odpowiedzialne jest za zmniejszenie czasów retencji analitów, natomiast najprawdopodobniej to odziaływania π-π i kation-π są odpowiedzialne za znaczącą poprawę symetrii sygnałów analitów.

Ostatnim wątkiem badawczym prezentowanym w ramach tego osiągnięcia są badania nad wykorzystaniem cieczy jonowych jako ektrahentów do odzysku farmaceutyków z odpadów farmaceutycznych (przeterminowanych tabletek). Eksperymenty wykonywano stosując dwa układy: ciało stałe-ciecz ([H11]) oraz wodne układy dwufazowe ([H5]). Pierwszy z nich zastosowano do odzyskiwania ibuprofenu testując możliwość użycia trzech cieczy jonowych, tj. chlorku tetrabutyloimidazoliowego ([N4444][Cl]), chlorku butylometyloimidazoliowego ([Bmim][Cl]) oraz chlorku benzylodimetylo(2-hydroksyetylo)amoniowego ([BzCh][Cl]) w mieszaninach z wodą i buforem cytrynianowym. Stwierdzono, że ([N4444][Cl] jako jedyna ciecz jonowa może samodzielnie rozpuszczać ibuprofen, natomiast pozostałe wymagają zastosowania buforu cytrynianowego (Rysunek 3, [H11]). Układ ([N4444][Cl] + bufor cytrynianowy został wytypowany do dalszych badań gdyż z jego zastosowaniem efektywność ekstrakcji ibuprofenu wyniosła niemal 100 %. Drugim etapem tych badań był odzysk ibuprofenu z fazy bogatej w ciecz jonową, co wykonywano poprzez dodatek tzw. przeciw-

rozpuszczalnika (ang. *anti-solvent*). W tym celu zastosowano wodny 25 % roztwór KCl w różnych stosunkach objętościowych, dzięki któremu wytrącał się osad ibuprofenu i obliczana była efektywność odzysku. Wytrącenie wynikało ze zwiększenia siły jonowej roztworu i zmniejszenia oddziaływań ibuprofen-kation amoniowy w cieczy jonowej. Wartość odzysku tego etapu wynosiła aż 97 %. Zasadność odzysku tego leku z odpadów wiąże się z faktem, iż jego synteza jest związana z użyciem toksycznych odczynników. Inne procesy odzysku ibuprofenu wiążą się z użyciem lotnych rozpuszczalników, natomiast ciecz jonową można w tak zaproponowanym układzie recyrkulować wielokrotnie (Rysunek 2, [H11]).

Badano także możliwość odzysku ibuprofenu, ketoprofenu i naproksenu z tabletek z wykorzystaniem wodnych układów dwufazowych. Układ taki powstaje, gdy zmiesza się ze sobą wodę, ciecz jonową rozpuszczalną w wodzie i sól rozpuszczalną w wodzie. Powstaje układ dwóch wodnych faz, z których górna jest nasycona cieczą jonową i posiada właściwości ekstrakcyjne. W trakcie ekstrakcji przeterminowanych tabletek powstawał układ trzyfazowy, gdyż składniki pomocnicze obecne w tabletkach gromadziły się pomiędzy dwiema wodnymi fazami. W badaniach wykorzystano te same ciecze jonowe jak w przypadku wcześniej opisanym oraz bufory cytrynianowe (Tabela 1, [H5]). Jednak w tym przypadku przeciw-rozpuszczalnikami były roztwory cytrynianu (dla ibuprofenu i naproksenu) lub siarczanu glinu (dla ketoprofenu). Dodatkowo potwierdzono stabilność badanych związków w trakcie przeprowadzania ekstrakcji, a jej efektywność przekraczała 85 %, niezależnie od ilości farmaceutyku, użytej cieczy jonowej, temperatury prowadzenia ekstrakcji czy pH użytego buforu (Rysunek 2-5, [H5]). Również w tym przypadku zaproponowano schemat systemu z możliwością recyrkulacji stosowanych odczynników (Rysunek 7, [H5]). Dzięki temu opracowano alternatywną metodę odzysku aktywnych substancji z odpadów farmaceutycznych, która może być także zaadoptowana do bardziej skomplikowanych matryc.

- **Podsumowanie**

Uzyskane w toku przeprowadzonych badań wyniki, stanowiące podstawę osiągnięcia habilitacyjnego, pozwalają na sformułowanie następujących głównych wniosków:

- Badania nad derywatyzacją acetaminofenu odczynnikiem BSTFA wykazały, że możliwa jest reakcja sililowania pomiędzy dwoma amidami [H3]; odczynnik BSTFA

może reagować z wymianą dwóch posiadanych przez siebie grup TMS, a nie tylko tej która przyłączona jest do jego cząsteczki poprzez atom tlenu.

- Odczynnik DIMETRIS okazał się skuteczny w derywatyzacji farmaceutyków z grupy NLPZ i umożliwił ich ilościowe oznaczenia w ściekach [H17]. Dla otrzymanych na etapie wyboru warunków pochodnych DMTFPS tych farmaceutyków otrzymywano zdecydowanie lepsze odpowiedzi detektora MS w stosunku do pochodnych z typowymi odczynnikami siliującymi. Opracowano przy tym szczegółowy schemat fragmentacji nowego rodzaju pochodnych i może on posłużyć w przyszłości do badań innego rodzaju pochodnych powstałych z zastosowaniem DIMETRIS. Zastosowanie tego sililanta do oznaczeń wieloskładnikowej mieszaniny farmaceutyków w próbkach wód gruntowych i powierzchniowych umożliwiło pionierskie badania pozostałości farmaceutyków w źródłach wody pitnej w Polsce.
- W ramach przeprowadzonych badań porównawczych różnych wypełnień ekstrakcyjnych do fazy stałej, stwierdzono, że złoże zbudowane z kopolimeru PS-DVB-VP jest najskuteczniejsze przy oznaczeniach leków z grup beta-blokerów i beta-agonistów [H14]. Metody oparte o te złoża z powodzeniem wykorzystano do ekstrakcji próbek środowiskowych lub doczyszczania ekstraktów podczas oznaczeń innych leków [H2, H4, H10, H13, H15-H17].
- Najwyższą efektywnością ekstrakcyjną w próbnikach pasywnych wykorzystujących ciecze jonowe (PASSIL) charakteryzują się sole z kationami alkilofosfoniowymi, przy czym wykazują one selektywność względem związków obojętnych i obdarzonych ładunkiem ujemnym [H9, H12]. Kalibracja próbników powinna się odbywać w warunkach możliwie bliskich tym panującym w środowisku (szczególnie ruch fazy donorowej, pH i zasolenie) [H1, H6].
- W stałych próbkach środowiskowych (gleby, osady jeziorne, tkanki organizmów) i osadach ściekowych możliwa jest analiza farmaceutyków z zastosowaniem wieloetapowych metod (MAE-SPE-GC-MS, MAE-SPE-LC-MS/MS, SLE-SPE-LC-MS/MS, ASE-SPE-GC-MS) o niskich metodycznych granicach wykrywalności i zaniedbywalnych efektach matrycowych [H4, H10, H15, H16]. Metody wymagają jednak każdorazowej optymalizacji warunków ekstrakcji w zależności od grupy farmaceutyków.

- Pozostałości wybranych farmaceutyków obecne były w większości z przebadanych próbek środowiskowych i tych pochodzących z oczyszczalni ścieków [H2, H4, H10, H13, H15-17]. Poziomy stężeń nie odbiegały od tych oznaczanych w innych częściach świata, niemniej sama obecność farmaceutyków powinna wzbudzić uwagę w związku z nieocenionymi do tej pory skutkami ich chronicznej obecności.
- Zrewidowany został mechanizm retencji związków zasadowych analizowanych w układach wysokosprawnej chromatografii cieczowej modyfikowanych cieczami jonowymi [H8]. Stwierdzono, że supresja wolnych silanoli nie jest dominującym efektem obecności w takim układzie kationów alkiloimidazoliowych czy anionów heksaflurofosforanowych.
- Ciecze jonowe mogą pełnić rolę efektywnych ekstrahentów farmaceutyków nie tylko w skali analitycznej, ale także ćwierć-technicznej; wybrane ciecze amoniowe okazały się skuteczne w procesie odzysku farmaceutyków z grupy NLPZ z przeterminowanych tabletek w różnych układach ekstrakcyjnych [H5, H11]. Istnieje możliwość budowy systemu do odzysku substancji aktywnych z recyrkulacją cieczy jonowej.

Literatura

Caban, M., Czerwicka, M., Łukaszewicz, P., Migowska, N., Stepnowski, P., Kwiatkowski, M., Kumirska, J., 2013a. A new silylation reagent dimethyl(3,3,3-trifluoropropyl)silyldiethylamine for the analysis of estrogenic compounds by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1301, 215–224. doi:10.1016/j.chroma.2013.05.073

Caban, M., Migowska, N., Stepnowski, P., Kwiatkowski, M., Kumirska, J., 2012. Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of beta-blockers and beta-agonists in environmental samples. J. Chromatogr. A 1258, 117–127. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.029

Caban, M., Mioduszewska, K., Stepnowski, P., Kwiatkowski, M., Kumirska, J., 2013b. Dimethyl(3,3,3-trifluoropropyl)silyldiethylamine--a new silylating agent for the derivatization of β-blockers and β-agonists in environmental samples. Anal. Chim. Acta 782, 75–88. doi:10.1016/j.aca.2013.04.018

Caban, M., Stepnowski, P., Kwiatkowski, M., Migowska, N., Kumirska, J., 2011. Determination of β-blockers and β-agonists using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry--a comparative study of the derivatization step. J. Chromatogr. A 1218, 8110–22. doi:10.1016/j.chroma.2011.08.093

Fernández-Navarro, J.J., García-Álvarez-Coque, M.C., Ruiz-Ángel, M.J., 2011. The role of the dual nature of ionic liquids in the reversed-phase liquid chromatographic separation of basic drugs. J. Chromatogr. A 1218, 398–407. doi:10.1016/j.chroma.2010.11.044

Kaliszan, R., Marszałł, M.P., Markuszewski, M.J., Baczek, T., Pernak, J., 2004. Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids. J. Chromatogr. A 1030, 263–271. doi:10.1016/j.chroma.2003.09.020

Kumirska, J., Migowska, N., Caban, M., Plenis, A., Stepnowski, P., 2011. Chemometric analysis for optimizing derivatization in gas chromatography-based procedures. J. Chemom. 25, 636–643. doi:10.1002/cem.1410

Maszkowska, J., Synak, E.E., Fabiańska, A., Caban, M., Stolte, S., Husson, P., Costa Gomes, M.F.M.F., Synak, R., Stepnowski, P., 2015. Preliminary study on suitability of ionic liquids as potential passive-sampling media of polyaromatic-hydrocarbon (PAH) analyses in water. Anal. Bioanal. Chem. 407, 3531–3536. doi:10.1007/s00216-015-8545-1

Sadkowska, J., Caban, M., Chmielewski, M., Stepnowski, P., Kumirska, J., 2017. Environmental aspects of using gas chromatography for determination of pharmaceutical residues in samples characterized by different composition of the matrix. Arch. Environ. Prot. 43, 3–9. doi:10.1515/aep-2017-0028

Sadkowska, J., Caban, M., Chmielewski, M., Stepnowski, P., Kumirska, J., 2017. Environmental aspects of using gas chromatography for determination of pharmaceutical residues in samples characterized by different composition of the matrix. Arch. Environ. Prot. 43. doi:10.1515/aep-2017-0028

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze można podzielić na następujące obszary tematyczne:

A. Zastosowanie nanorurek w procesach analitycznych

Jedno- i wielościenne nanorurki węglowe to materiały coraz częściej wykorzystywane w celach analitycznych ze względu na unikatowe właściwości sorpcyjne względem szerokiej gamy analitów organicznych i nieorganicznych. We współrealizowanych badaniach naukowych wykorzystywano je do oznaczeń związków z grupy WWA i metali ciężkich z wykorzystaniem dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej [U3]. Co ważne, można to wykonać przy jednej ekstrakcji stosując sekwencyjne wymywanie, co uzyskano w niniejszych badaniach. Proces ten wymagał wyboru odpowiednich warunków, takich jak optymalna ilość i rodzaj użytych odczynników oraz rodzaj i rozmiar nanorurek. Stwierdzono, że 50 mg sorbentu (nanorurek modyfikowanych grupami hydroksylowymi lub karboksylowymi) wystarcza na ekstrakcję wybranych analitów z 250 ml wodnej próbki z efektywnością powyżej 64 % (Tabela 2, [U3]). Badania te są obecnie kontynuowane dla farmaceutyków.

B. Ocena ryzyka (eko)toksykologicznego obecności farmaceutyków w środowisku

W ramach tych prac podjęto badania nad toksykologicznym efektami obecności farmaceutyków i ich mieszanin w środowisku wodnym z wykorzystaniem przedłużonych testów toksyczności [U2] oraz badania toksyczności mieszaniny sulfonamidów

w stosunku do glonów zielonych [U5]. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie całego szeregu nowych wniosków znacząco wykraczających poza proste oznaczenia toksyczności ostrej pojedynczych związków. Z kolei w pracach [U14, U15] przeprowadzono kompleksową ocenę występowania beta-blokerów w środowisku wodnym i glebowym. Zbadano ich potencjał rozprzestrzeniania się oraz główne drogi degradacji, a także ich toksyczny wpływ na różnych poziomach troficznych (bakterie morskie, glebowe, glony zielone i rzęsa wodna). Podobnie, w oparciu o uzyskane dane monitoringowe i literaturowe wartości współczynników toksyczności, przeprowadzono analizę obecności wybranych leków przeciwpasożytniczych na terenie północnej Polski [U8]. Stwierdzono w tym przypadku niewielkie ryzyko środowiskowe oraz potrzebę badań wszechstronnych, tj. obejmujących obecność tych związków w próbkach stałych i wodnych w danym rejonie.

C. Wykorzystanie wodnych układów dwufazowych do izolacji białek

Badane w osiągnięciu habilitacyjnych układy dwufazowe zastosowano także do procesu oczyszczania białek [U13]. W tym przypadku układ powstawał z wykorzystaniem cieczy jonowej o kationie choliniowym i glikolu polipropylenowego. Ekstrahując albuminę surowicy bydlęcej osiągnięto całkowitą ekstrakcję tego białka bez oznak denaturacji. Zaproponowany prosty i szybki system ekstrakcyjny może zostać wykorzystany także w celu izolacji innych wartościowych białek, w tym markerów chorób.

D. Projekt NonHazCity

W ramach projektu „NonHazCity” (Interreg, 2016-2019) i współpracy z ponad dwudziestoma partnerami z krajów nadbałtyckich zbadano źródła obecności takich zanieczyszczeń jak plastyfikatory (ftalany), bisfenol A, alkilofenole, związki perfluorowane i metale ciężkie. Dla większości tych analitów opracowano nowe metody, które wdrożono do analiz ponad 100 próbek wody ściekowej i opadowej pobranych z wielu miast nadbałtyckich (raport dostępny na http://nonhazcity.eu/). Wyniki zbiorcze posłużą do informowania mieszkańców na temat wszechobecności substancji niebezpiecznych w ich otoczeniu, a także przedsiębiorstw i gmin na temat źródeł zanieczyszczeń tego typu i sposobów eliminacji (na przykład przez zielone zamówienia).

E. Opublikowanie prac przeglądowych

Prace przeglądowe stanowiące uzupełnienie osiągniecia naukowego skupiały się na zagadnieniach związanych z analityką, losami i toksycznością pozostałości farmaceutyków. Rozwój analizy chemicznej wymagał usystematyzowania wiedzy, określenia zalet i wad rozwiązań oraz zaproponowania kierunków rozwojowych.

Jak wcześniej wspomniano, podczas prac skupiono się na wykorzystaniu chromatografii gazowej jako narzędzia oferującego szereg zalet, ale także takiego, które posiada swoje ograniczenia (co opisano w [U1] i [U4]). Technika GC okazała się narzędziem konkurencyjnym i bardziej dostępnym, jednak niewiele podmiotów obecnych na krajowym rynku korzysta z niego w pełni. Natomiast sam rynek usług oznaczeń pozostałości farmaceutyków w środowisku jest obecnie na wstępnym etapie rozwoju. Jak również nadmieniono we wstępie i opisano w [U7], oznaczenia farmaceutyków w środowisku stanowią niewątpliwie wyzwanie analityczne. Wynika to z faktu, iż farmaceutyki to niejednorodna grupa analitów, które występują we wszystkich niemal matrycach środowiskowych, które charakteryzują się złożonością i zmiennością. Różne grupy tych analitów wymagają odmiennych rozwiązań w przypadku ich analizy w próbkach wody pitnej, morskiej czy stałych próbkach gleby lub osadów. Konieczność posiadania różnych narzędzi i metodyk dla różnych składników środowiska jest więc często koniecznością.

W pracy [U6] przedstawiono takie metody dla najczęściej wykrywanych w środowisku farmaceutyków z grup antybiotyków, hormonów steroidowych, leków obniżających ciśnienie krwi, neuroaktywnych, przeciwzapalnych i przeciwbólowych. Dane literaturowe zebrane w tej pracy pozwoliły na ocenę potencjałów bioakumulacyjnych wybranych grup farmaceutyków. Natomiast w pracy [U11] przedstawione zostało krytyczne studium wpływu antybiotyków w środowisku rolniczym. Opisano takie zagadnienia jak źródła i drogi przedostawania się, stabilność w środowisku, wymywanie z gleb do wód gruntowych, toksyczność dla organizmów tam bytujących, możliwości remediacji dzięki pobieraniu przez rośliny, czy też obecnie funkcjonującą legislację w tym temacie. Obecność farmaceutyków w środowisku wód gruntowych została opisana w pracach [U9] i [U10]. Przedstawiono dostępne metodyki z krytyczną ich oceną i porównaniem oraz występowanie (stężenia i częstość wykrywania) farmaceutyków w tej ważnej dla zdrowia ludzi matrycy [U10]. Przedstawiono także takie zagadnienia jak identyfikację źródeł zanieczyszczenia wód pitnych, sposoby eliminacji tego

rodzaju śladowych ilości zanieczyszczeń (ze wskazaniem możliwości powstania pochodnych produktów dezynfekcji), trwałość w wodzie pitnej, konieczność wyboru identyfikatorów zanieczyszczeń, oceny ryzyka i powstania wymogów prawnych.

Spis publikacji uzupełniających, które ukazały się po uzyskaniu stopnia doktora:

[U1] J. Sadkowska*, **M. Caban**, M. Chmielewski, P. Stepnowski, J. Kumirska, 2017, The use of gas chromatography for determining pharmaceutical residues in clinical, cosmetic, food and environmental samples in the light of the requirements of the sustainable development, Archives of Environmental Protection, przyjęte do druku lipiec 2018. **IF_{2014} = 0,855**

[U2] A. Białk-Bielińska*, M. Matzke, **M. Caban**, S. Stolte, J. Kumirska, P. Stepnowski, 2018, Effects of five sulphonamides on duckweed (Lemna minor) after prolonged exposure time and their dependency on photoradiation, Science of the Total Environment, 618, 952-960. **IF_{2016} = 4,900**

[U3] M. Paszkiewicz*, **M. Caban**, A. Bielicka-Giełdoń, P. Stepnowski, 2017, Optimization of a procedure for the simultaneous extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and metal ions by functionalized and non-functionalized carbon nanotubes as effective sorbents, Talanta, 165, 405-411. **IF_{2016} = 4,244**

[U4] J. Sadkowska*, **M. Caban**, M. Chmielewski, P. Stepnowski, J. Kumirska, 2017, Environmental aspects of using gas chromatography for determination of pharmaceutical residues in samples characterized by different composition of the matrix, Archives of Environmental Protection, 43, 3-9. **IF_{2014} = 0,855**

[U5] A. Białk-Bielińska*, **M. Caban**, A. Pieczyńska, P. Stepnowski, S. Stolte, 2017, Mixture toxicity of six sulfonamides and their two transformation products to green algae *Scenedesmus vacuolatus* and duckweed *Lemna minor,* Chemosphere, 173, 542-550. **IF_{2016} = 4,208**

[U6] A. Puckowski*, K. Mioduszewska, P. Łukaszewicz, M. Borecka, **M. Caban**, J. Maszkowska, P. Stepnowski, 2016, Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 127, 232-255. **IF_{2016} = 3,255**

[U7] A. Białk-Bielińska*, J. Kumirska, M. Borecka, **M. Caban**, M. Paszkiewicz, K. Pazdro, P. Stepnowski, 2016, Selected analytical challenges in the determination of pharmaceuticals

in drinking/marine waters and soil/sediment samples, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 121, 271-296. **IF_{2015} = 3,169**

[U8] J. Kumirska*, M. Wagil, S. Stolte, M. Maksymiuk, A. Puckowski, J. Maszkowska, A. Białk-Bielińska, **M. Caban**, P. Stepnowski, 2016, Anthelmintics in the aquatic environment: a new approach in their determination, Current Analytical Chemistry, 12, 227-236. **IF_{2015} = 1,238**

[U9] **M. Caban***, J. Kumirska, A. Białk-Bielińska, P. Stepnowski, 2016, Current issues in pharmaceutical residues in drinking water, Current Analytical Chemistry, 12, 249-257. **IF_{2015} = 1,238**

[U10] **M. Caban***, J. Kumirska, A. Białk-Bielińska, P. Stepnowski, 2016, Analytical techniques for determining pharmaceutical residues in drinking water — state of art and future prospects, Current Analytical Chemistry, 12, 237-248. **IF_{2015} = 1,238**

[U11] P. Łukaszewicz, J. Maszkowska, Mulkiewicz E., J. Kumirska, P. Stepnowski, **M. Caban***, 2016, Impact of Veterinary Pharmaceuticals on the Agricultural Environment: A Re-inspection. [w:] Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 243. (Ed. P. de Voogt). Springer, Cham, 89-148. **IF_{2015} = 3,747**

[U12] J. Maszkowska*, E. Synak, A. Fabiańska, **M. Caban**, S. Stolte, P. Husson, M. Costa Gomes, R. Synak, P. Stepnowski, 2015, Preliminary study on suitability of ionic liquids as potential passive-sampling media of polyaromatic-hydrocarbon (PAH) analyses in water, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407, 3531–3536. **IF_{2015} = 3,125**

[U13] M.V. Quental, **M. Caban**, M.M. Pereira, P. Stepnowski, J.A.P. Coutinho, M.G. Freire*, 2015, Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as phase-forming components of aqueous biphasic systems, Biotechnology Journal, 10, 17–25. **IF_{2013} = 3,781**

[U14] J. Maszkowska, S. Stolte, J. Kumirska*, P. Łukaszewicz, K. Mioduszewska, A. Puckowski, **M. Caban**, M. Wagil, P. Stepnowski, A. Białk-Bielińska, 2014, Beta-blockers in the environment: Part I. Mobility and hydrolysis Study, Science of the Total Environment, 493, 1112-1121. **IF_{2013} = 4,099**

[U15] J. Maszkowska, S. Stolte, J. Kumirska*, P. Łukaszewicz, K. Mioduszewska, A. Puckowski, **M. Caban**, M. Wagil, P. Stepnowski, A. Białk-Bielińska, 2014, Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study, Science of the Total Environment, 493, 1122-1126. **IF_{2013} = 4,099**

5.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych

Osiągniecia naukowo-badawcze zdobyte przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych związane były z realizacją pracy doktorskiej (w latach 2009 – 2013), przede wszystkim z opracowywaniem metod analiz farmaceutyków z zastosowaniem chromatografii gazowej. Przeprowadzono szereg prac związanych z optymalizacją procesu derywatyzacji [D1, D2, D3, D6, D7], sprawdzenia efektów matrycowych towarzyszących technice chromatografii gazowej [D5] oraz wykorzystaniu opracowanych metodyk do oznaczeń próbek środowiskowych [D4]. Dzięki tym badaniom dostarczono wiele cennych informacji w dziedzinie chemii analitycznej farmaceutycznych zanieczyszczeń środowiska. Dane środowiskowe uzyskane w ten sposób były jednymi z pierwszych w Polsce i wymagały uzupełnienia, co stało się główną inspiracją dla kontynuowania tych badań po uzyskaniu stopnia doktora.

Spis publikacji uzupełniających, które ukazały się przed uzyskaniu stopnia doktora

[D1] **M. Caban**, M. Czerwicka, P. Łukaszewicz, N. Migowska, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, J. Kumirska*, 2013, A new silylation reagent dimethyl(3,3,3-trifluoropropyl) silyldiethylamine for the analysis of estrogenic compounds by gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1301, 215-224. **IF = 4,531**

[D2] J. Kumirska*, A. Plenis, P. Łukaszewicz, **M. Caban**, N. Migowska, A. Białk-Bielińska, M. Czerwicka, P. Stepnowski, 2013, Chemometric optimization of derivatization reactions prior to gas chromatography–mass spectrometry analysis, Journal of Chromatography A, 1296, 164–178. **IF = 4,531**

[D3] **M. Caban***, K. Mioduszewska, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, J. Kumirska, 2013, DIMETRIS (dimethyl(3,3,3-trifluoropropyl)silyldiethylamine) - a new silylating agent for the derivatization of beta-blockers and beta-agonists in environmental samples, Analytica Chimica Acta, 782, 75-88. **IF = 4,144**

[D4] N. Migowska, **M. Caban**, P. Stepnowski, J. Kumirska*, 2012, Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection, Science of the Total Environment, 441, 77-88. **IF = 3,286**

[D5] **M. Caban**, N. Migowska, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, J. Kumirska*, 2012, Matrix

effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of beta-blockers and beta-agonists in environmental samples, Journal of Chromatography A, 1258, 117-127. **IF = 4,531**

[D6] J. Kumirska*, N. Migowska, **M. Caban**, A. Plenis, **P. Stepnowski**, 2011, Chemometric analysis for optimizing derivatization in gas chromatography-based procedures, Journal of Chemometrics, 25, 636-643. **IF = 1,858**

[D7] **M. Caban**, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, N. Migowska, J. Kumirska*, 2011, Determination of β-blockers and β-agonists using gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry – A comparative study of the derivatization step, Journal of Chromatography A, 1218, 8110-8122. **IF = 4,069**

5.3. Dalsze plany naukowe

Dalsze plany naukowe związane są nie tylko z rozszerzeniem obecnie prowadzonych badań z zakresu analityki chemicznej farmaceutyków, ale też pogłębianiem wiedzy w zakresie efektów tych i innych nowopojawiających się zanieczyszczeń w środowisku.

Obecnie prowadzone są wstępne badania nad zastosowaniem cieczy jonowych jako matryc w technice jonizacji MALDI (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation*) do analiz małych cząsteczek, w tym farmaceutyków. Wykorzystywane są protyczne ciecze jonowe powstałe w reakcji kwasowych standardowych matryc (np. kwasu synapinowego) i amin o różnej budowie (np. *N,N*-diizopropyloetyloaminy). Nową klasę matryc bada się pod względem właściwości fizykochemicznych oraz użyteczności do oznaczeń ilościowych. Celem badań jest dostarczenie szybkiej metody oznaczeń ilościowych leków w różnego rodzaju próbkach, ale też zbadanie właściwości nowej klasy cieczy jonowych.

Kolejnym wątkiem obecnie realizowanych zadań badawczych we współpracy z zespołem prof. Wojciecha Ciesielskiego z Uniwersytetu Matematyczno-Przyrodniczego w Częstochowie jest zastosowanie biowęgla (materiału powstałego w procesie pirolizy w materiału roślinnego) do sorpcji farmaceutyków w ściekach i glebie. Ich celem jest sprawdzenie możliwości wykorzystania materiału, który powstaje jako odpad w procesach produkcji bio-paliw. Ostatecznie biowęgiel ma posłużyć rozwiązaniu niektórych problemów ochrony środowiska, gdyż polepsza strukturę gleby, jej pojemność wodną, wprowadza wolno uwalniające się biogeny oraz służy jako sorbent zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych.

Prowadzone są także badania nad oceną skutków występowania farmaceutyków w środowisku we współpracy z zespołem Prof. Anny Szaniawskiej z Instytutu Oceanografii UG. Prowadzony jest obecnie monitoring obecności leków w wodach morskich i małżach pobranych w Zatoce Gdańskiej oraz laboratoryjna ocena możliwości bioakumulacji leków w organizmach morskich. Celem badań jest sprawdzenie czy potwierdzona już obecność leków w środowisku Morza Bałtyckiego wpływa negatywnie na kondycję bytujących tam organizmów.

W ramach współpracy z oczyszczalnią w Sochaczewie, rozpoczęto także badania akumulacji farmaceutyków i innych zanieczyszczeń (m.in. WWA, ftalany) w roślinach, gdyż oczyszczalnia ta posiada unikatowy system wspomagania oczyszczania z zastosowaniem nasadzeń na reaktorze biologicznym. Badania mają na celu sprawdzenie czy rośliny rosnące w takich warunkach mają potencjał wspomagania usuwania zanieczyszczeń antropogenicznych.

Podsumowując prowadzone będą wielowątkowe badania z różnych dziedzin, dzięki czemu zostanie otrzymana wiedza z pogranicza chemii / ochrony środowiska / inżynierii środowiska / nauk społecznych. Celem jest zrozumienie zachodzących negatywnych procesów w środowisku wynikających z antropopresji. Celem powiązanym jest rzetelne, podparte badaniami informowanie społeczeństwa o stanie środowiska, co poskutkować może zmianą nawyków, na przykład w kwestii utylizacji odpadów farmaceutycznych czy stosowanych środków chemicznych.

5.4. Zestawienie dorobku naukowego i innych osiągnięć

Stan na dzień 17.09.2018 r.	A. Przed doktoratem	B. Po doktoracie	C. W tym do cyklu habilitacyjnego	Razem (A+B)
Indeks H (Web of Science)			**12**	
Liczba publikacji z listy filadelfijskiej	7	32	17	39
Liczba publikacji spoza listy filadelfijskiej	1	9		10
IF sumaryczny	**27,044**	**108,778**	**64,727**	**135,822**
Liczba cytowań (Web of Science) • bez autocytowań • z autocytowaniami	 165 219	 319 404	 66 84	 **385** **488**
Rola w publikacjach z cyklu habilitacyjnego • pierwszy autor • autor korespondencyjny • autor ostatni • inny			 7 6 5 5	
Liczba rozdziałów w książkach	0	1	0	**1**
Liczba wystąpień ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych • jako autor referujący • jako współautor	 1 0	 9 16		 **10** **16**
Liczba plakatowych komunikatów	40	48		**88**
Liczba realizowanych projektów w charakterze • kierownika • wykonawcy(eksperta)	 1 	 1 3		 **2** **3**

Caban Magda

Magda Caban